

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR II



TESIS DOCTORAL

**Papel de las isoformas del receptor de insulina
en la regulación de la homeostasia glucídica y
lipídica en un modelo de diabetes experimental**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Sabela Díaz-Castroverde Vicario

DIRECTORES

Manuel R. Benito de las Heras
Óscar Escribano Illanes

Madrid, 2017



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR II

Tesis Doctoral

Papel de las isoformas del receptor de insulina en la regulación de la homeostasia glucídica y lipídica en un modelo de diabetes experimental

Sabela Díaz-Castroverde Vicario
Madrid, 2016

Tesis Doctoral

Papel de las isoformas del receptor de insulina en la regulación de la homeostasia glucídica y lipídica en un modelo de diabetes experimental

Esta memoria ha sido presentada por la licenciada Sabela Díaz-Castroverde Vicario para optar al grado de Doctor por el programa de doctorado RD1393/2007 de la Universidad Complutense de Madrid.

Directores de la tesis

Dr. Manuel R. Benito de las Heras

Dr. Óscar Escribano Illanes

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid y financiado por una beca del consorcio MOIR y por los proyectos de investigación CAM S2010/BMD-2423, MINECO SAF2011/22555 y SAF2014-51795-R y CIBERDEM PIE14/00061.

Gracias,

A todos aquellos que han escalado a mi lado por la cara norte,
especialmente a Pilatos, padres, Javi, Vane, Nuria, Tamara y
Minutti.

A todos aquellos que fueron poniendo amarres,
especialmente a Gema, Silvia y Elena; Elisa y David e Irene.

A todos aquellos que me enseñaron que la cara sur también
existe,
especialmente a Bea Gracillán, Alberto Bartolomé y Carmen
Arce.

A todos aquellos que me han presentado a la ciencia y me han
acogido a su lado,
especialmente a mis directores, al laboratorio de Gloria, al
laboratorio de Becky, a los inmunitos originales, a BBMI y,
como no, al laboratorio 21.

A mi gran amiga Ale, que ha dejado este libro bien bonito.

A mi madre, que se ha leído hasta los insufribles materiales y
métodos.

A Vane, otra vez.

A todos, gracias.

00/

índice

16	01/ RESUMEN
25	02/ SUMMARY
33	03/ ABREVIATURAS
39	04/ INTRODUCCIÓN
41	1. DIABETES TIPO 2 Y PAPEL DEL RECEPTOR DE INSULINA EN LA HOMEOSTASIA GLUCÍDICA
41	1.1 LA DIABETES EN LA ACTUALIDAD
43	1.2 FISIOPATOLOGÍA DE LA DIABETES TIPO 2
45	1.3 MODELOS ANIMALES EN LA INVESTIGACIÓN DE LA DIABETES TIPO 2: VÍA DEL RECEPTOR DE INSULINA Y DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO INSULÍNICO TIPO I.
	1.3.1 MODELOS <i>KNOCKOUT</i> ESPECÍFICOS DE TEJIDO
	1.3.2 LA NECESIDAD DE LOS MODELOS <i>KNOCKOUT</i> INDUCIBLES Y ESPECÍFICOS DE TEJIDO: MODELO ILIRKO.
	1.3.3 MECANISMOS DE COMPENSACIÓN: OTROS MODELOS <i>KNOCKOUT</i>
48	2. RECEPTOR DE INSULINA E IGF-I
48	2.1 ESTRUCTURA DE LOS RECEPTORES, ISOFORMAS DEL RECEPTOR DE INSULINA Y RECEPTORES HÍBRIDOS
51	2.2 VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA Y EL IGF-I
53	2.2.1 RUTA PI3K/PKB
	2.2.2 RUTA RAS/MAPK
	2.2.3 MODULACIÓN DE LA CAPTACIÓN DE GLUCOSA EN LOS HEPATOCITOS

53	2.3 FUNCIÓN DEL HÍGADO EN EL CONTROL METABÓLICO
54	2.4 INTRODUCCIÓN AL METABOLISMO DEL GLUCÓGENO: REGULACIÓN POR GLUCOSA-6-FOSFATO
	2.4.1 GLUCÓGENO SINTASA HEPÁTICA
	2.4.2 GLUCÓGENO SINTASA QUINASA 3
	2.4.3 REGULACIÓN ESPECÍFICA POR LA GLUCOSA-6-FOSFATO
	2.4.4 DEGRADACIÓN DEL GLUCÓGENO
58	3. PAPEL DE LA CÉLULA β PANCREÁTICA EN LA HOMEOSTASIA METABÓLICA. PLASTICIDAD DE LA MASA DE CÉLULA β PANCREÁTICA
58	3.1 APOPTOSIS EN LAS CÉLULAS β PANCREÁTICAS
59	3.2 EFECTO GLUCOTÓXICO EN LAS CÉLULAS β PANCREÁTICAS
60	4. EJE DE COMUNICACIÓN HÍGADO-PÁNCREAS
60	5. DESREGULACIONES EN EL METABOLISMO LIPÍDICO ASOCIADOS A DIABETES TIPO 2
63	6. TERAPIA GÉNICA CON VIRUS ADENOASOCIADOS
63	6.1 DESCRIPCIÓN DE LOS VIRUS ADENOASOCIADOS
	6.1.1 VECTOR VIRAL
	6.1.2 SEROTIPOS VIRALES: TROPISMO CELULAR
64	6.2 RESPUESTA INMUNE FRENTE A LOS VIRUS ADENOASOCIADOS
65	6.3 CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS ADENOASOCIADO SEROTIPO 8
66	6.4 ENSAYOS CLÍNICOS EN MARCHA CON VIRUS ADENOASOCIADOS
	6.4.1 TERAPIA GÉNICA CON VIRUS ADENOASOCIADOS EN ENFERMEDADES METABÓLICAS
71	05/ OBJETIVOS
77	06/ MATERIALES Y MÉTODOS
79	1. TRABAJO CON MODELOS ANIMALES
80	1.1 CRÍA Y GENOTIPAJE DE ANIMALES
	1.1.1 MANTENIMIENTO DEL MODELO ILIRKO
	1.1.2 OBTENCIÓN DE ADN DE COLA DE RATÓN
	1.1.3 GENOTIPAJE
80	1.2 GENERACIÓN DEL MODELO INDUCIBLE
	1.2.1 PRUEBAS ADMINISTRACIÓN DEL TAMOXIFENO: VÍA ENTERAL O VÍA PARENTAL.
	1.2.2 ESQUEMA DE DIETAS O ESQUEMA DEFINITIVO PARA LA GENERACIÓN DEL MODELO INDUCIBLE
82	1.3 TESTS METABÓLICOS <i>in vivo</i>
	1.3.1 TEST DE TOLERANCIA A GLUCOSA
	1.3.2 TEST DE TOLERANCIA A INSULINA
82	1.4 OBTENCIÓN DE PLASMA SANGUÍNEO
83	1.5 SACRIFICIO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN
83	2. CULTIVOS CELULARES
83	2.1 LÍNEAS CELULARES Y MEDIOS DE CULTIVO
83	2.2 CONDICIONES DE CULTIVO, MANTENIMIENTO Y EXPERIMENTACIÓN
	2.2.1 CONDICIONES DE CULTIVO
	2.2.2 CONGELACIÓN, CRIOPRESERVACIÓN Y DESCONGELACIÓN DE LÍNEAS CELULARES

	2.2.3 CONDICIONES DE EXPERIMENTACIÓN
	2.2.3.1 MICOPLASMA
84	3. TÉCNICAS DE ADN RECOMBINANTE
84	3.1. CULTIVO DE BACTERIAS
	3.1.1 CULTIVO EN PLACA DE AGAR-LB
	3.1.2 CULTIVO EN LB LÍQUIDO
	3.1.3 CONGELACIÓN (GLYCEROL-STOCK)
85	3.2 PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS Y TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS
	3.2.1 PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS
	3.2.2 TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS
86	3.3 CLONAJE Y TRABAJO CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN
	3.3.1 DIGESTIÓN CON ENZIMAS
	3.3.2 PRECIPITACIÓN DEL ADN PLASMÍDICO CON ACETATO SÓDICO Y ETANOL
	3.3.3 GENERACIÓN DE EXTREMOS ROMOS
	3.3.4 DEFOSFORILACIÓN DE LOS EXTREMOS DEL VECTOR
	3.3.5 PURIFICACIÓN DE BANDAS DE GELES DE AGAROSA
	3.3.6 LIGACIÓN Y CRIBADO DE COLONIAS POSITIVAS
	3.3.7 SECUENCIACIÓN
88	4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA
88	4.1 AISLAMIENTO DE ARN DE LÍNEAS CELULARES Y TEJIDOS
88	4.2 RT-PCR
	4.2.1 VALORACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS
	4.2.2 SÍNTESIS DE ADNc POR RETROTRANSCRIPCIÓN
	4.2.3 PCR Y ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA
	4.2.4 PCR CUANTITATIVA
90	5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS
90	5.1 EXTRACTOS PROTEICOS
	5.1.1 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS
	5.1.2 VALORACIÓN DE PROTEÍNAS
91	5.2 WESTERN BLOT
	5.2.1 PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA ELECTROFORESIS
	5.2.2 ELECTROFORESIS EN GELES DE SDS-PAGE
	5.2.3 TRANSFERENCIA A MEMBRANAS DE PVDF
	5.2.4 BLOQUEO E INCUBACIÓN CON ANTICUERPOS
	5.2.5 DETECCIÓN DE ANTICUERPOS POR QUIMIOLUMINISCENCIA
	5.2.6 BORRADO DE MEMBRANAS DE PVDF
94	5.3 INMUNOPRECIPITACIÓN
95	6. INMUNOHISTOQUÍMICA E INMUNOFLUORESCENCIA DE SECCIONES PANCREÁTICAS Y HEPÁTICAS
95	6.1 PREPARACIÓN DE LOS TEJIDOS PARA LAS TINCIONES
	6.1.1 FIJACIÓN DE TEJIDOS Y OBTENCIÓN DE CORTES
	6.1.2 DESPARAFINIZACIÓN E HIDRATACIÓN DE CORTES
96	6.2 TINCIÓN CON HEMATOXILINA Y EOSINA

96	6.3. INMUNOFLUORESCENCIA EN SECCIONES PANCREÁTICAS O HEPÁTICAS
97	6.4 INMUNOHISTOQUÍMICA EN SECCIONES HEPÁTICAS Y PANCREÁTICAS
97	7. OBTENCIÓN DE PARTÍCULAS VIRALES
97	7.1. PRODUCCIÓN DE PARTÍCULAS VIRALES
	7.1.1 PURIFICACIÓN DE LAS PARTÍCULAS VIRALES
99	7.2 TITULACIÓN DE LAS PARTÍCULAS VIRALES
100	7.3 ADMINISTRACIÓN DE LOS AAV A LOS ANIMALES
100	7.4 ENSAYOS DE BIOLUMINISCENCIA
100	8. TEST METABÓLICOS
100	8.1 <i>ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY</i> (ELISA) DE INSULINA
100	8.2 METABOLISMO GLUCÍDICO
	8.2.1 DETERMINACIÓN DE LA SÍNTESIS DE GLUCÓGENO EN CULTIVO CELULAR
	8.2.2 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN GLUCÓGENO EN CULTIVO CELULAR Y HEPÁTICO
	8.2.2.1 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN GLUCÓGENO EN CULTIVO CELULAR
	8.2.2.2 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN GLUCÓGENO HEPÁTICO
	8.2.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA GLUCÓGENO SINTASA HEPÁTICA
	8.2.4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA GLUCÓGENO FOSFORILASA HEPÁTICA
102	8.3 METABOLISMO LIPÍDICO
	8.3.1 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DEL TOTAL DE LOS LÍPIDOS HEPÁTICOS
	8.3.2 ENSAYOS COLORIMÉTRICOS PARA LA MEDIDA DE COLESTEROL Y TRIGLICÉRIDOS
	8.3.3 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE SEPARACIÓN RÁPIDA DE PROTEÍNAS
103	9. OTRAS TÉCNICAS
103	9.1. CUANTIFICACIÓN
	9.1.1. <i>BLOTS</i>
	9.1.2. IMÁGENES DE INMUNOHISTOQUÍMICA E INMUNOFLUORESCENCIA
103	9.2. ESTADÍSTICA
104	9.3. TÉCNICAS BIOINFORMÁTICAS
	9.3.1. TRABAJO CON SECUENCIAS DE ADN
	9.3.2. TRABAJO CON IMÁGENES
104	10. MATERIALES
107	07/ RESULTADOS
145	08/ DISCUSIÓN
157	09/ CONCLUSIONES
163	10/ BIBLIOGRAFÍA

01/

resumen

PAPEL DE LAS ISOFORMAS DEL RECEPTOR DE INSULINA EN LA REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIA GLUCÍDICA Y LIPÍDICA EN UN MODELO DE DIABETES EXPERIMENTAL

INTRODUCCIÓN

La diabetes tipo 2 es una enfermedad metabólica compleja cuya patogénesis implica fallos tanto en la acción periférica de la insulina como en su secreción. En el estado postprandial, el hígado regula la homeostasia glucídica por medio de la captación de glucosa y su conversión a glucógeno y lípidos (von Wilamowitz-Moellendorff *et al.*, 2013). La desregulación de los mecanismos por los cuales la glucosa y la insulina dirigen el metabolismo del glucógeno es una de las principales

causas que provocan la diabetes tipo 2, la enfermedad metabólica más común entre la población mundial (Leibiger *et al.*, 2001).

El receptor de insulina pertenece a la superfamilia de receptores tirosina quinasa, concretamente a la subclase II, y juega un papel fundamental en el metabolismo de la glucosa. El receptor de insulina está estrechamente relacionado con otros miembros de la familia, como el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina, el cual está implicado en procesos de crecimiento y desarrollo (Benyoucef *et al.*, 2007; Ward *et al.*, 2009). En mamíferos, el *splicing* alternativo del exón 11 del gen del receptor de insulina da lugar a dos isoformas: A y B. Concretamente, la isoforma B posee 12 aminoácidos extra localizados inmediatamente después del dominio de unión a ligando, aunque no afecta a su afinidad por la insulina, la cual es muy similar entre las dos isoformas (Menting

et al., 2013; Whittaker *et al.*, 2002). Sin embargo, la isoforma A del receptor de insulina tiene, aproximadamente, 10 veces más afinidad por los factores de crecimiento insulínicos tipo I y II que la isoforma B (Malaguarnera *et al.*, 2011). Además, la isoforma A del receptor de insulina se expresa predominantemente durante el desarrollo embrionario, favoreciendo así los efectos del factor de crecimiento insulínico tipo II (Frasca *et al.*, 2009). Por el contrario, la isoforma B del receptor de insulina se expresa de forma predominante en tejidos adultos, incluido el hígado, en los cuales dirige los efectos metabólicos de la insulina (Malaguarnera y Belfiore, 2011).

La conversión de glucosa a glucógeno es uno de los puntos clave por los cuales el hígado retira glucosa de la circulación en el estado postprandial (Agius 2008). La señalización de glucosa e insulina regulan de forma precisa la síntesis de glucógeno por diferentes mecanismos. La vía de señalización de síntesis de glucógeno más estudiada es aquella que está dirigida por la insulina, la cual inicia una cascada de eventos que dan lugar a la activación de la proteína quinasa B. Ésta fosforila y activa a la glucógeno sintasa quinasa-3 (en la Ser 21 de la glucógeno sintasa quinasa-3 α y en la Ser 9 de la glucógeno sintasa quinasa-3 β) (Frame *et al.*, 2001; McAulay *et al.*, 2007). La glucógeno sintasa quinasa-3 α/β fosforila cuatro de las nueve serinas reguladoras (Ser 641, Ser 645, Ser 649, Ser 653) que juegan un papel fundamental en la inhibición de la actividad de la glucógeno sintasa hepática y, en consecuencia, de la síntesis de glucógeno (Roach *et al.*, 2012). La glucógeno sintasa hepática, además de su regulación covalente mediante fosforilación por la glucógeno sintasa quinasa-3 α/β , está controlada por la glucosa-6-fosfato, que actúa como activador alostérico (Roach *et*

al., 2012). La glucosa-6-fosfato se une a la glucógeno sintasa hepática, la regula a través de su activación alostérica y promueve su eficiente defosforilación, acoplado todo ello a una localización celular apropiada (Gomis *et al.*, 2003; von Wilamowitz-Moellendorff *et al.*, 2013).

Aunque la insulina no estimula la captación de glucosa por los hepatocitos, estudios *in vitro* en hepatocitos neonatales demuestran que la isoforma A del receptor de insulina se asocia con el transportador de glucosa tipo 2, lo que favorece la captación de glucosa (Nevado *et al.*, 2006). Por tanto, las diferencias en la captación de glucosa se podrían asociar con la presencia/ausencia de las isoformas del receptor de insulina o con cambios en la proporción en la que se expresan. Sin embargo, hasta la fecha no se conoce el papel específico que desempeña cada isoforma del receptor de insulina.

Para tratar de profundizar en ello, aprovechamos la capacidad de los virus adenoasociados de expresar vectores recombinantes en el hígado durante un largo periodo de tiempo. En la pasada década, los virus adenoasociados se convirtieron en uno de los vectores de transfección más prometedores para el tratamiento de enfermedades humanas. Los virus adenoasociados son capaces de infectar células que puedan o no dividirse, obteniéndose una expresión mantenida durante largos periodos de tiempo y sin efectos adversos (Verma *et al.*, 2005). Estudios preclínicos en ratones muestran que los virus adenoasociados son capaces de inducir, con gran eficiencia y de forma estable, la expresión de un gen provocando una baja inmunogenicidad. Además, su administración sistémica permite la transducción de un alto porcentaje de hepatocitos por vectores que se habían empaquetado en el serotipo 8, lo que ha

demostrado un verdadero potencial en el tratamiento de enfermedades hepáticas, relacionadas con el metabolismo de hidratos de carbono, en modelos animales.

OBJETIVOS

Glucosa e insulina regulan de forma precisa la síntesis de glucógeno mediante diversos mecanismos, los cuales se encuentran desregulados en la diabetes tipo 2. En esta tesis hemos utilizado el modelo *knockout* inducible para el receptor de insulina hepático como modelo de progresión a la diabetes tipo 2. Como se ha descrito anteriormente, la isoforma A del receptor de insulina favorece la captación de glucosa en hepatocitos *in vitro* en comparación con la isoforma B (Nevado *et al.*, 2006). Por tanto, la expresión de la isoforma A del receptor de insulina en el modelo *knockout* inducible para el receptor de insulina hepático podría tener el mismo efecto y disminuir así la hiperglucemia e incrementar la síntesis de glucógeno.

MÉTODOS

Se estudió el papel de las isoformas del receptor de insulina *in vitro* en hepatocitos neonatales inmortalizados e *in vivo* en el modelo diabético murino *knockout* inducible para el receptor de insulina en el hígado.

Para llevar a cabo este objetivo, generamos un modelo de progresión a la diabetes tipo 2 y severa resistencia a insulina hepática, ratones *knockout* inducibles para el receptor de insulina hepático. La expresión de las isoformas del receptor de insulina en estos animales se consiguió mediante el uso de virus adenoasociados. Éstas se colocaron bajo la regulación del promotor

α 1-antitripsina y, los vectores resultantes, se incluyeron en el serotipo viral 8, con el fin de estudiar la función hepática de cada isoforma en la reversión de la resistencia a insulina en los ratones *knockout* inducible para el receptor de insulina en el hígado. En estos animales estudiamos el papel de las isoformas del receptor de insulina tanto en la síntesis y almacenamiento de glucógeno como en la homeostasia glucídica, para lo que se realizaron diversos tests metabólicos, y su efecto en la distribución de la masa de célula β , que se estudió mediante técnicas de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.

Para profundizar en el metabolismo del glucógeno, utilizamos líneas celulares de hepatocitos neonatales que expresaban la isoforma A o B del receptor de insulina. Estudiamos diversas proteínas de las cascadas de señalización relacionadas con la síntesis de glucógeno y, en algunos casos, sus actividades por medio de ensayos colorimétricos o de radiactividad.

RESULTADOS

En este estudio se utilizó el modelo murino *knockout* inducible para el receptor de insulina en el hígado como modelo experimental de diabetes tipo 2. Este modelo muestra una resistencia a insulina inicial, debido a la carencia del receptor de insulina en hígado, la cual se compensa con una marcada hiperinsulinemia e hiperplasia de la célula β pancreática. Nuestros resultados demuestran que la resistencia a insulina global y la homeostasia glucídica pueden modificarse de forma diferencial en función de la isoforma del receptor de insulina expresada en el hígado. La expresión selectiva de la isoforma A es capaz de restablecer totalmente la tolerancia a glucosa e insulina, mientras

que la B tan sólo restablece parcialmente la sensibilidad a insulina. Estos efectos podrían deberse a la asociación entre el transportador de glucosa tipo 2 y el receptor de insulina en los ratones *knockout* inducibles para el receptor de insulina que expresan la isoforma A. La asociación específica del transportador de glucosa tipo 2 con la isoforma A del receptor de insulina sugiere que puede deberse a la estructura del receptor, es decir, a la ausencia del exón 11, más que a cambios estructurales inducidos por la unión del ligando, ya que ambas isoformas presentan igual afinidad por la insulina.

Además, en los ratones *knockout* inducibles para el receptor de insulina que expresan la isoforma A se observa una recuperación de los niveles de insulina, acompañado de una disminución en la masa de célula β pancreática, hasta alcanzar valores similares a los de los ratones Control. Sin embargo, el caso de los ratones *knockout* inducibles para el receptor de insulina que expresan la isoforma B, estos parámetros se mantuvieron semejantes a los de los ratones *knockout* inducibles para el receptor de insulina. Estos resultados sugieren un papel diferencial de las isoformas del receptor de insulina en la regulación de la homeostasia glucídica.

Nuestros resultados *in vitro* sugieren una fuerte correlación entre un incremento en la señalización por insulina y un incremento en la síntesis y contenido en glucógeno en los hepatocitos que expresan la isoforma A del receptor de insulina. Además de la captación de glucosa incrementada, el contenido de glucosa intracelular está favorecido en los hepatocitos que expresan la isoforma A del receptor de insulina, ya que expresan niveles mayores de glucoquinasa. Este aumento en la glucosa intracelular favorece también la actividad de la glucógeno sintasa hepática.

Lo contrario ocurre en los hepatocitos que expresan la isoforma B del receptor de insulina, donde tanto la expresión de la glucoquinasa como la captación de glucosa se encuentran disminuidas.

En ausencia del receptor de insulina, los hepatocitos muestran un incremento en la síntesis de glucógeno que se correlaciona con una mayor inhibición de la glucógeno sintasa quinasa-3 α/β en comparación con las células Control en condiciones basales. Sin embargo, existe una activación significativa de la glucógeno fosforilasa que podría explicar la falta de un incremento significativo en los depósitos de glucógeno en los hepatocitos que carecen del receptor de insulina. Todo esto sugiere la presencia de un ciclo fútil en el punto de síntesis/degradación de glucógeno.

CONCLUSIONES

En conclusión, esta tesis amplía el conocimiento en la regulación de la homeostasia glucídica y la síntesis de glucógeno en hepatocitos neonatales *in vitro* y en un escenario diabético específico *in vivo* en los ratones *knockout* inducibles para el receptor de insulina. Los datos aquí presentados sugieren que la isoforma A favorece la homeostasia glucídica, además de aumentar la síntesis y contenido de glucógeno. Así, la expresión de la isoforma A del receptor de insulina en el hígado podría ser una estrategia interesante para el control de la homeostasia glucídica y la resistencia a insulina.

02/

summary

ROLE OF THE INSULIN RECEPTOR ISOFORMS IN THE REGULATION OF GLUCOSE AND LIPID HOMEOSTASIS IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF DIABETES

INTRODUCTION

Type 2 diabetes is a complex metabolic disease and its pathogenesis involves abnormalities in both peripheral insulin action and insulin secretion. In the postprandial state, liver regulates glucose homeostasis by glucose uptake and conversion to glycogen and lipids (von Wilamowitz-Moellendorff *et al.*, 2013). The malfunction of these mechanisms,

by which glucose and insulin regulate glycogen metabolism, is one of the major causes of type 2 diabetes, the most common metabolic disorder in the worldwide population (Leibiger *et al.*, 2001).

The insulin receptor is a member of subclass II of the tyrosine kinase receptor super-family that plays an essential role in glucose metabolism. Insulin receptor is closely related to other members of this family like the insulin-like growth factor receptor which is involved in normal growth and development (Benyoucef *et al.*, 2007; Ward *et al.*, 2009). In mammals, alternative splicing gives rise to two isoforms of insulin receptor: A and B. The isoform B has 12 additional amino acids encoded by the exon 11 (Whittaker *et al.*, 2002). This sequence is located immediately downstream of the ligand binding domain but does not affect insulin binding affinity which is very similar between A and B (Menting *et al.*, 2013; Whittaker *et al.*,

2002). However, insulin receptor A isoform has approximately 10 fold higher affinity for insulin-like growth factor-I and II than insulin receptor B isoform (Malaguarnera *et al.*, 2011). Moreover, insulin receptor A isoform is predominantly expressed during foetal development and embryogenesis where enhances insulin-like growth factor-II effects (Frasca *et al.*, 1999). Conversely, insulin receptor B isoform is predominantly expressed in adult tissues, including liver, where it triggers the metabolic effects of insulin (Malaguarnera & Belfiore, 2011).

The conversion of glucose into glycogen is one of the key pathways by which the liver removes glucose in the postprandial state (Agius 2008). Glucose and insulin signaling finely regulate glycogen synthesis by several mechanisms. The best-documented signalling pathway resulting in glycogen synthesis is triggered by insulin, which initiates a cascade of events that activate protein kinase B/Akt. Protein kinase B phosphorylates glycogen synthase kinase-3 (Ser 21 of glycogen synthase kinase-3 α and Ser 9 of glycogen synthase kinase-3 β) resulting in its inactivation (Frame *et al.*, 2001; MacAulay *et al.*, 2007). Glycogen synthase kinase-3 α/β phosphorylates four out of nine regulatory serine residues (Ser 641, Ser 645, Ser 649, Ser 653), which play a critical role in inhibiting hepatic glycogen synthase activity and hence glycogen synthesis (Roach *et al.*, 2012). Hepatic glycogen synthase, in addition to a reversible phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 α/β , is controlled by the allosteric activator glucose-6-phosphate (Roach *et al.*, 2012). Glucose-6-phosphate binding to hepatic glycogen synthase has composite effects in controlling glycogen synthesis through allosteric activation and efficient dephosphorylation coupled with appropriate cellular localization (Gomis *et*

al., 2003; von Wilamowitz-Moellendorff *et al.*, 2013).

Although insulin does not stimulate glucose uptake in the liver, *in vitro* studies in neonatal hepatocytes demonstrate that insulin receptor isoform A plays a direct role favoring glucose uptake through its specific association with endogenous glucose transporter 2 (Nevado *et al.*, 2006). Therefore, differences in the capability of glucose uptake can be associated with the presence/absence of insulin receptor isoforms or with changes in their ratio. However, nowadays the functional significance of each insulin receptor isoform remains unclear.

In an effort to try to elucidate it we took advantage of the capacity of recombinant adenoassociated vectors to deliver recombinant genes to the liver that can be expressed long term. In the past decade, adenoassociated viruses have been shown as one of the most promising gene transfer vectors for treatment of human diseases. Adenoassociated viruses are able to infect dividing and non-dividing cells obtaining long-term expression without adverse effects (Verma *et al.*, 2005). Preclinical studies in small animal models have shown that adenoassociated viruses are able to induce highly efficient and stable gene expression with low immunogenicity. Indeed, following systemic administration it has been possible to transduce a high proportion of mouse hepatocytes with vectors packaged into capsid 8 serotype, demonstrating an outstanding therapeutic potential in animal models for hepatic disorders of carbohydrate metabolism.

AIMS

In the postprandial state, liver regulates glucose homeostasis by glucose uptake

and conversion to glycogen and lipids. Glucose and insulin signaling finely regulate glycogen synthesis by several mechanisms, which are deregulated in type 2 diabetes. In the present study, we have used inducible liver insulin receptor knockout mice, as a model of progression of type 2 diabetes. As previously described, insulin receptor isoform A favors glucose uptake in hepatocytes as compared to isoform B (Nevado *et al.*, 2006). Thus, we hypothesized that insulin receptor isoform A expressed in inducible liver insulin receptor knockout mice could decrease hyperglycemia and increase glycogen synthesis.

METHODS

We addressed the role of insulin receptor isoforms on glycogen metabolism *in vitro* in immortalized neonatal hepatocytes and *in vivo* in inducible liver insulin receptor knockout mice.

For this purpose, we have generated an experimental model of progression of type 2 diabetes and severe hepatic insulin resistance. We have conducted and produced adenoassociated virus vectors expressing insulin receptor A or B isoform in order to study the hepatic function of each insulin receptor isoform in the reversion of insulin resistance in inducible liver insulin receptor knockout mice. For that, we expressed A and B isoforms specifically in the liver *in vivo* into the capsid 8 serotype and under the control of α -1 antitrypsin promoter. We studied the role of insulin receptor isoforms on glycogen synthesis and storage and glucose homeostasis in these mice, by performing several metabolic tests, and their effect on the β cell mass distribution

by immunohistochemistry.

We went in deep in the glycogen metabolism by using neonatal hepatocytes cell lines which expressed A or B isoform of the insulin receptor. We studied several proteins related to glycogen metabolism signaling pathways and, in some cases, their activities performing colorimetric or radioactivity assays.

RESULTS

In this study, we used inducible liver insulin receptor knockout mice as a model of type 2 diabetes. This model has shown that initial hepatic insulin resistance induced by insulin receptor deletion is compensated by a marked hyperinsulinemia, achieved by an increased β cell mass. Our results demonstrate that global insulin resistance and therefore glucose homeostasis can be modified depending on the insulin receptor isoform expressed in the liver. Selective expression of insulin receptor isoform A was able to restore glucose and insulin tolerance while isoform B only partially improves insulin sensitivity. These effects could be because the association between glucose transporter 2 and insulin receptor A in inducible liver insulin receptor knockout mice expressing A isoform. Given that the hyperglycaemia is only decreased in inducible liver insulin receptor knockout mice expressing isoform A, this could be one of the mechanisms involved in the differential improvement of glucose intolerance. In fact, the favored association between glucose transporter 2 and insulin receptor in inducible liver insulin receptor knockout mice expressing isoform A mice suggests that it is a matter of insulin receptor structure, due to the presence/absence of exon 11, instead of structural changes induced upon ligand

binding, given the fact that both isoforms present the same affinity for insulin.

Moreover, we observed a maintained recovery of insulin levels in inducible liver insulin receptor knockout expressing isoform A mice which is accompanied by a decrease in β cell mass down to control values. In the case of insulin receptor B isoform injected mice, β cell mass and plasma insulin levels were similar to those observed in untreated inducible liver insulin receptor knockout mice. These results demonstrate that insulin resistance persists in inducible liver insulin receptor knockout expressing B isoform suggesting a differential role of both isoforms in the regulation of glucose homeostasis.

Our *in vitro* results suggest a strong correlation between the enhanced insulin signaling and the increased glycogen synthesis and storage in response to insulin in hepatocytes, which expressed insulin receptor A isoform vs B isoform. In addition to glucose uptake, intracellular glucose disposal is favored because of the higher expression of glucokinase in insulin receptor A isoform cells and hence, hepatic glycogen synthase activity. The opposite was found in insulin receptor B isoform hepatocytes, where both, glucose uptake and glucokinase expression were significantly decreased. In the absence of insulin receptor, hepatocytes showed an increased glycogen synthesis correlated with higher glycogen synthase kinase-3 α/β inhibition when compared to Control cells under basal conditions. In contrast, a remarkable activation of glycogen phosphorylase could explain the lack of significant glycogen storage in cells without insulin receptor, suggesting a glycogen synthesis/glycogen depletion futile cycle to compensate the loss of glucose input by the absence of insulin receptors.

CONCLUSIONS

In conclusion, our results highlight the central and complex role played by hepatic IR isoforms in the control of hepatic glucose metabolism. We now provide a new insight about the role of insulin receptor A isoform in the regulation of glycogen metabolism in cultured hepatocytes and in the liver in a diabetic scenario. Our data strongly suggest that insulin receptor A isoform, but not B isoform, not only increases glucose uptake, but also favors glycogen synthesis and storage and glucose homeostasis. Therefore, we suggest that insulin receptor A isoform expression in the liver could be an interesting gene therapy strategy for the treatment of hepatic insulin resistance and glucose intolerance.

03/

abreviaturas

ABCA1 transportador dependiente de la unión a ATP, familia A, miembro 1

ABCG1 transportador dependiente de la unión a ATP, familia G, miembro 1

Alb albúmina

AMP adenosín monofosfato

ATP adenosín trifosfato

βIGFIRKO *knockout* específico del IR e IGF-IR en células β pancreáticas

βIRKO *knockout* específico del IR en células β pancreáticas

bp pares de bases

BSA albúmina de suero bovino

CE colesterol esterasa

CETP proteína que transfiere los ésteres de colesterol

CO colesterol oxidasa

CT extremo carboxi-terminal

DAPI 4',6'-diamidino-2-fenilindol

ddH₂O agua bidestilada

ER receptores de hormonas esteroideas

F1P fructosa-1-fosfato

FBS suero fetal bovino

FELASA *Federation of European Laboratory Animal Science Associations*

FIRKO *knockout* específico del IR en tejido adiposo blanco

FoXO *FoxO Forkhead box* clase O

FPLC *Fast Protein Liquid Chromatography*

G1P glucosa-1-fosfato

G6P glucosa-6-fosfato

GCK glucoquinasa

GK glicerol quinasa

GLUT2 transportador de glucosa 2

GP_a forma activa de la glucógeno fosforilasa

GP_b enzima en su conformación inactiva

GPO glicerolfosfato oxidasa

GSK3 glucógeno sintasa quinasa 3

GTT test de tolerancia a glucosa

GYS1 glucógeno sintasa muscular

GYS2 glucógeno sintasa hepática

HDL partículas lipoproteicas de alta densidad

HK hexoquinasa

HRP peroxidasa de rábano

HRs receptores híbridos

ID dominio de inserción

IGF-I factor de crecimiento insulínico tipo I

IGF-II factor de crecimiento insulínico tipo II

IGF-IR receptor del factor de crecimiento insulínico tipo I

iLIRIGFIRKO *knockout* inducible específico del IR e IGF-IR en hígado

iLIRKO *knockout* inducible específico del IR en hígado

IP inmunoprecipitación

IR receptor de insulina

IRA receptor de insulina isoforma A

IRB receptor de insulina isoforma B

IRS sustratos del receptor de insulina

ITR repetición terminal invertida

ITT test de tolerancia a insulina

K_m constante de Michaelis-Menten

LB *Lysogeny (Luria-Bertani) Broth*

LCAT lecitina colesterol aciltransferasa

LDL partículas lipoproteicas de baja densidad

LG2KO *knockout* para GLUT2 en hígado

LIRKO *knockout* específico del IR en hepatocitos

LP lipasa

MAPK proteínas quinasa activadas por mitógenos

MIRKO *knockout* específico del IR en músculo

MODY *Maturity Onset Diabetes of the Young*

mTOR *mammalian Target Of Rapamycin*

NIRKO *knockout* específico del IR en neuronas

p70S6K p70S6 quinasa

PCR *Polymerase Chain Reaction*

PK1 proteína quinasa dependiente de fosfoinosítidos tipo 1

PEI polietilenimina

PEG polietilenglicol

PH dominios de homología a la pleckstrina

Pi fosfato inorgánico

PI3K fosfatidilinositol 3'-quinasa

PIP₂ fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato

PIP₃ fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato

PKB proteína quinasa B

PMSF fluoruro de fenilmetilsulfonilo

POD peroxidasa

PP1 proteína fosfatasa 1

PTB dominios de unión a fosfotirosina

PYGB glucógeno fosforilasa cerebral

PYGL glucógeno fosforilasa hepática

PYGM glucógeno fosforilasa muscular

PVDF polifluoruro de vinilideno

RE retículo endoplásmico

SA albúmina sérica

SDS dodecilsulfato sódico

SDS-PAGE *Sodium Dodecyl Sulfate
Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

SH2 dominios de homología de Src tipo 2

SRB1 *scavenger* receptor, clase B, miembro 1

TEMED N,N,N,N'-tetrametilnediamina

Tm temperatura de *melting*

TUNEL *Terminal deoxynucleotidyl transferase
dUTP Nick End Labeling*

VLDL partículas lipoproteicas de muy baja densidad

WB *Western blot*

Los acrónimos se encuentran siempre definidos la primera vez que son mencionados en el texto.

Esta lista recoge algunas de las abreviaturas que aparecen en múltiples ocasiones.

04/

introducción

1. DIABETES TIPO 2 Y PAPEL DEL RECEPTOR DE INSULINA EN LA HOMEOSTASIA GLUCÍDICA

1.1. LA DIABETES EN LA ACTUALIDAD

La disponibilidad continua de alimentos, muchos de ellos de alta densidad calórica, unida a la proliferación de tecnologías que fomentan el sedentarismo, están provocando que la obesidad y sus comorbilidades sean la epidemia del siglo XXI en el mundo occidental.

De entre las comorbilidades asociadas, la prevalencia de la diabetes está sufriendo

un espectacular aumento. El número de diabéticos a nivel global en el año 2015 fue de 415 millones y se prevé que sean 642 millones en el 2040, lo cual supondría un aumento de la prevalencia desde el 8,8 % al 10,4 %. Este porcentaje podría incrementarse aún más ya que 318 millones de adultos padecen intolerancia a la glucosa, lo que supone que tienen un alto riesgo de desarrollar diabetes en un futuro (*International Diabetes Federation*, 2015). Los resultados del estudio Di@bet sobre la diabetes en España (Marcuello *et al.*, 2012) acreditan una prevalencia del 12 % en nuestro país en 2012, último año del que se tienen datos. El crecimiento de la población urbana en los países en desarrollo, junto con el envejecimiento general de la población, son las principales causas demográficas que incidirán en la prevalencia futura de la diabetes. En concreto, en áreas rurales la diabetes afecta a 145.1 millones de personas y casi al doble, 269.7 millones, en áreas urbanas (IDF, 2015).

Este aumento de la prevalencia de la diabetes es un problema de salud pública de primer orden ya que incrementa notablemente el riesgo de desarrollar otras enfermedades, en comparación con la población no enferma. Así, la diabetes aumenta el riesgo de enfermedad cardíaca, infarto y complicaciones microvasculares como retinopatía, nefropatía y neuropatía periférica. Además, la propia enfermedad es una contraindicación para muchos tratamientos. Y, al dificultar estos tratamientos, surgen complicaciones que se convierten en la principal causa de mortalidad prematura en pacientes diabéticos (Russel y Cooper, 2015) (**Figura 1**).

es aproximadamente cuatro veces mayor que el de un paciente no diabético. La mayoría de los países gastan entre el 5 % y el 20 % de su presupuesto total de salud en el tratamiento de esta enfermedad (IDF, 2015). Debe tenerse en cuenta también que la prevalencia para los próximos años sigue aumentando. Así, con un coste tan alto, la enfermedad es un obstáculo para el desarrollo económico sostenible y un reto importante para los sistemas de asistencia sanitaria.

La aparición de diabetes tipo 2 entre individuos cada vez más jóvenes, junto con el cambio de hábitos de vida en los países en

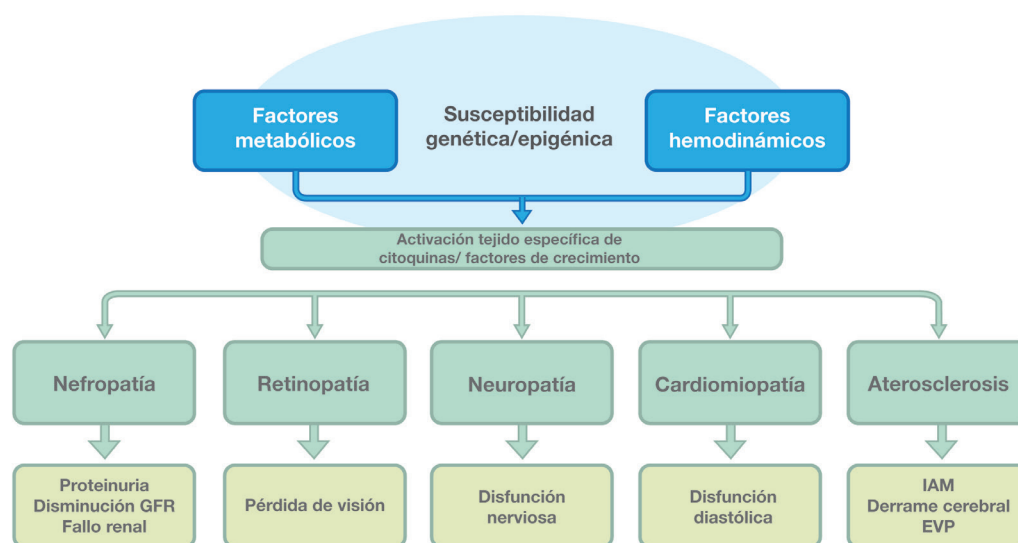


Figura 1. Mecanismos de las complicaciones diabéticas.

Las complicaciones diabéticas surgen como combinación de procesos patológicos comunes. Figura adaptada de Russer y Cooper, 2015.

Además de la carga económica que supone la compra de insulina y otras medicinas esenciales para los individuos o familiares de enfermos diabéticos, la diabetes produce también un impacto económico sustancial en los sistemas nacionales de salud. Las complicaciones provocadas por la diabetes son una de las principales causas de consulta médica e ingreso hospitalario. Por lo que el coste para la sanidad nacional de un paciente diabético

desarrollo, han convertido la obesidad y la diabetes en importantes problemas que la humanidad debe afrontar desde diferentes ámbitos. La educación y prevención son claves, aunque la modificación de hábitos que lleven a una menor ingesta calórica y a un aumento de la actividad física resulta difícil de implementar en la población general. En muchos casos, la intervención farmacológica se convierte en el único recurso. Por tanto, es necesario

establecer nuevas estrategias preventivas y tratamientos, guiados siempre desde la investigación científica.

1.2. FISIOPATOLOGÍA DE LA DIABETES TIPO 2

La diabetes es una enfermedad caracterizada por un aumento de la glucosa en sangre asociada a resistencia a insulina o a la ausencia de ésta. Existen tres principales tipos de diabetes: tipo 1 (8-10 % del total de pacientes diabéticos), tipo 2 (90 % del total de pacientes diabéticos) y gestacional. Otro tipo, menos común, en torno a un 2 %, es la diabetes de carácter monogénico, producida a causa de la mutación en un gen. Ejemplos de ésta última son las llamadas MODY (*Maturity Onset Diabetes of the Young*). Fundamentalmente, las mutaciones se producen en factores transcripcionales importantes en el desarrollo de la célula β pancreática o en la glucoquinasa (GCK). Alrededor de 15 genes diferentes han sido identificados como responsables de las diabetes monogénicas (Murphy *et al.*, 2008).

La principal diferencia entre diabetes tipo 1 y 2 se encuentra en la etiología. La diabetes tipo 1 es una enfermedad autoinmune en la que se destruye de forma irreversible la célula β pancreática. La enfermedad comienza a manifestarse en la infancia o adolescencia y requiere de aporte externo de insulina diario.

La diabetes tipo 2 aparece, generalmente, en la población adulta, pero su prevalencia en adolescentes y niños va en aumento. Se caracteriza por intolerancia a glucosa y resistencia a insulina. Aunque las causas exactas que dan lugar a esta enfermedad se desconocen, hay una serie de factores de riesgo relacionados. Los más impor-

tantes son el exceso de peso, el sedentarismo y una dieta rica en calorías y grasas. Otros factores relacionados son la edad y el historial familiar. En las fases iniciales de la enfermedad, el control de los niveles de glucosa en sangre suele llevarse a cabo con medicamentos orales. Si la hiperglucemia persiste, los pacientes diabéticos tipo 2 necesitan dosis diarias de insulina. Debe tenerse en cuenta que existe un estado pre-diabético, caracterizado por la intolerancia a glucosa, que padece un alto porcentaje de la población. La intolerancia a glucosa puede derivar en diabetes tipo 2. Ésta, en combinación con un estado de resistencia a insulina, e independientemente de presentar hiperglucemia, son considerados como potenciales factores de riesgo para desarrollar también enfermedad cardiovascular (Russel y Cooper, 2015) ([Figura 2](#)).

Son varios los tejidos que tienen un papel clave en el desarrollo de la resistencia a insulina y la diabetes ([Figura 3](#)). El tejido adiposo blanco, que fisiológicamente sirve como depósito de lípidos, puede saturarse y provocar una redistribución anormal de los lípidos en otros tejidos. Además, produce multitud de hormonas denominadas adipocitoquinas (leptina, resistina, adiponectina, IL-6, TNF α , etc.), cuya presencia o carencia juega un importante papel en el desarrollo de la resistencia a insulina (Muoio y Newgard, 2005). Otro tejido importante en la regulación de la homeostasia glucídica es el músculo esquelético, ya que es el tejido que más glucosa consume del organismo (Stumvoll *et al.*, 2005). Debido al papel fundamental que desempeña el hígado en el metabolismo, su correcto funcionamiento resulta clave para el mantenimiento de la homeostasia glucídica. Y, por descontado, es completamente fundamental la insulina secretada por las células β pancreáticas, tras la ingesta (Saltiel y Kahn, 2001).

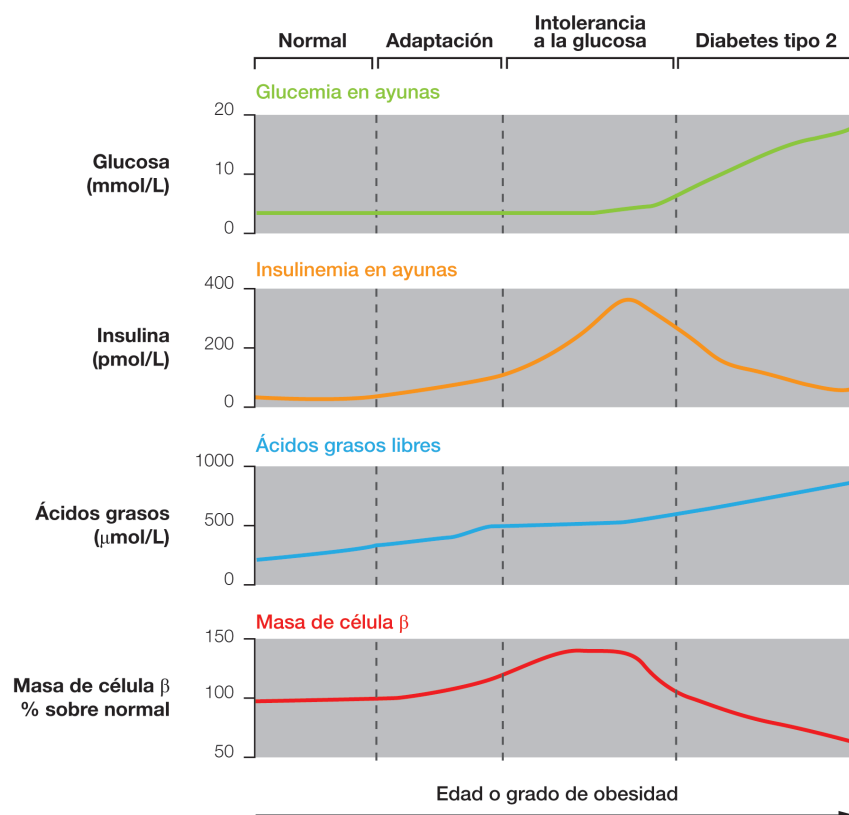


Figura 2 Comparación de la evolución de los niveles de glucosa en sangre, con la insulinemia, los ácidos grasos libres y la masa de célula β durante la progresión a la diabetes. El punto de inflexión lo representa el fracaso de la célula β , lo que conlleva una disminución de la insulina circulante y la manifestación de la diabetes. Figura adaptada de Lingohr *et al.*, 2002.

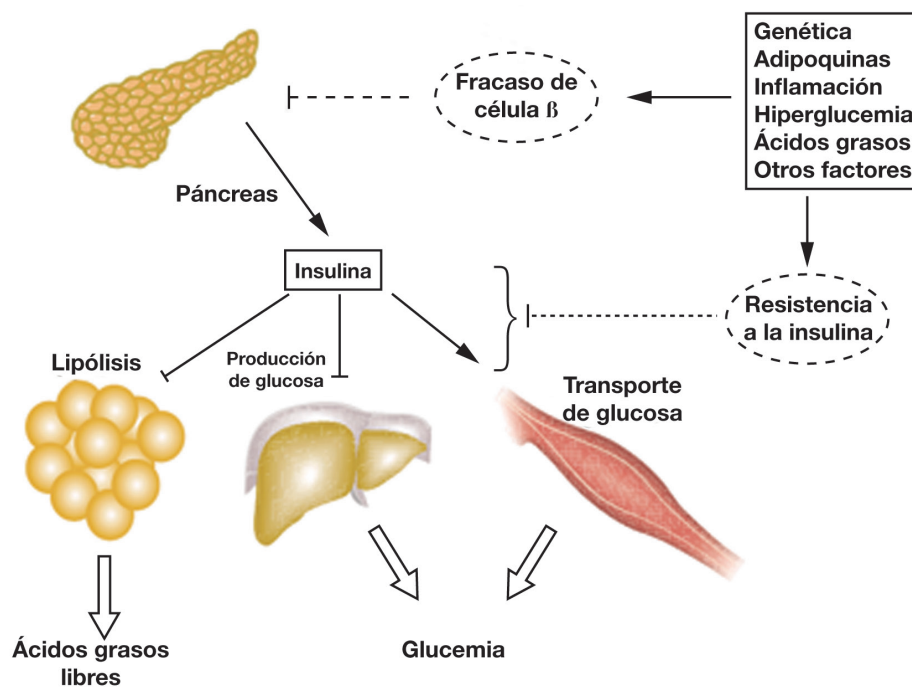


Figura 3 Esquema de los diferentes órganos implicados en la progresión a la diabetes. Figura adaptada de Stumvoll *et al.* 2005.

1.3. MODELOS ANIMALES EN LA INVESTIGACIÓN DE LA DIABETES TIPO 2: VÍA DEL RECEPTOR DE INSULINA Y DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO INSULÍNICO TIPO I

La diabetes tipo 2 es una enfermedad poligénica que puede dar lugar a complicaciones en diversos tejidos (Neubauer y Kulkarni, 2006). Puesto que resulta complicado el estudio detallado de los mecanismos moleculares implicados con muestras humanas, se han utilizado distintos modelos murinos. Para investigar la fisiopatología de la diabetes tipo 2 y examinar su potencial relación con la obesidad, estos modelos incluyen diferentes aproximaciones para su inducción: genética, farmacológica, quirúrgica y alimenticia (Islam y Wilson, 2012). La utilización de los modelos murinos ha cobrado relevancia ya que son fáciles de manipular genéticamente, presentan un tiempo corto generacional y son relativamente baratos. Así, desde mediados de los años noventa, ratones transgénicos y *knockout* han sido importantes herramientas para estudiar el papel individual de diversas proteínas en el desarrollo de la diabetes (Neubauer y Kulkarni, 2006).

La insulina y el factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I) son conocidos por su papel fundamental en el metabolismo y en el desarrollo de casi todos los tejidos en mamíferos. Por tanto, no resulta sorprendente que los estudios dirigidos hacia la creación de modelos murinos de diabetes se centrasen en estas proteínas y en algunas de las principales dianas de su cascada de señalización (Neubauer y Kulkarni, 2006).

Después de la síntesis y liberación de la insulina tras la estimulación por glucosa en las células β pancreáticas del islote, ésta se une a su receptor, presente en diferentes tejidos metabólicos como el hígado, el músculo esquelético y el órgano adiposo. Tras la unión a sus receptores, la insulina favorece la autofosforilación en tirosina, lo cual activa la ruta de los sustratos de receptor de insulina (IRS)/fosfatidilinositol 3'-quinasa (PI3K) y la ruta de Ras/proteínas quinasa activadas por mitógenos (MAPK) (Backer *et al.*, 1992; Folli *et al.*, 1992; Sun *et al.*, 1991). El *knockout* global para el receptor de insulina (IR) desarrolla hiperglucemia e hipercetonemia horas después del nacimiento y muere días después por cetoacidosis diabética (Accili *et al.*, 1996). Este fenotipo contrasta con el que presentan los pacientes con mutaciones en el IR, los cuales muestran un severo retraso en el desarrollo y un fenotipo diabético poco marcado (Taylor 1992). Las diferencias en las manifestaciones clínicas pueden deberse a la severidad que provoca el defecto genético, a la capacidad del receptor mutante de formar híbridos con el receptor del factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-IR) y al *background* genético que module el estado de resistencia a insulina. Como la diabetes tipo 2 es de carácter poligénico, los enfermos diabéticos pueden presentar polimorfismos en múltiples genes que codifiquen para proteínas implicadas en la señalización de insulina, la secreción de ésta o el metabolismo que regula (Saltiel y Kahn, 2001).

1.3.1. Modelos *knockout* específicos de tejido

Debido al fenotipo letal que presenta el *knockout* global del IR, surgió la necesidad de crear *knockout* específicos

de tejido para proseguir la investigación de la diabetes. Para generar estos animales, la estrategia Cre-loxP fue fundamental. Brevemente, en el sistema Cre (procedente del bacteriófago P1) la recombinasa escinde fragmentos de DNA que están flanqueados por las secuencias loxP (Sauer y Henderson, 1989). Para generar los *knockout* tejido-específicos, los animales que portan el gen de interés flanqueado por las secuencias loxP se cruzan con animales que expresan la recombinasa Cre bajo un promotor específico del tejido de interés. Tras la activación de la recombinasa, el gen de interés se escinde en el tejido específico donde se expresa el promotor.

bro es, además, la principal diana de la acción de la insulina (Bruning *et al.*, 2000). Por tanto, la señalización de insulina en el cerebro es fundamental para mantener la homeostasia glucídica y prevenir el desarrollo de la diabetes. La eliminación específica del IR en la grasa blanca de los ratones (modelo FIRKO) provoca un fenotipo más delgado y protección frente a la obesidad derivada del envejecimiento, lo que sugiere que la alteración de la señalización de insulina en los tejidos adiposos blancos es crítica en la patogénesis subyacente a la obesidad (Bluher *et al.*, 2002). En 2001, nuestro grupo describió que los ratones *knockout* para el IR en el tejido adiposo marrón desarrollaban un

Afinidad relativa para la unión de ligando de las isoformas del IR, IGF-IR y HRs que contienen IRA o IRB

Receptor	Insulin	IGF-II	IGF-I	Reference
IRA	++++	+++	+ / ++	Yamaguchi <i>et al.</i> (1993), Frasca <i>et al.</i> (1999), Benyoucef <i>et al.</i> (2007)
IR-B	++++	+ - / +	-	Yamaguchi <i>et al.</i> (1993), Frasca <i>et al.</i> (1999), Benyoucef <i>et al.</i> (2007)
IGF-IR	-	+++ / +++++	++++	Pandini <i>et al.</i> (2002), Denley <i>et al.</i> (2004), Benyoucef <i>et al.</i> (2007)
HR-A	- / ++	+++ / +++++	+++ / +++++	Pandini <i>et al.</i> (2002), Slaaby <i>et al.</i> (2006), Benyoucef <i>et al.</i> (2007)
HR-B	-	++ / +++++	+++	Pandini <i>et al.</i> (2002), Slaaby <i>et al.</i> (2006), Benyoucef <i>et al.</i> (2007)

Tabla 1. Afinidad relativa para la unión de ligando de las isoformas del IR, IGF-IR y HRs que contienen IRA o IRB. Tabla adaptada de Malaguarnera y Belfiore, 2011.

Ejemplos de *knockout* tejido-específicos para el IR se resumen en la [Tabla 1](#). Por ejemplo, aunque la presencia de las moléculas de la cascada de señalización de la insulina se habían descrito en el cerebro (Folli *et al.*, 1994), la eliminación específica del IR en las neuronas de los ratones (modelo NIRKO) describe que el cere-

defecto en la secreción de insulina que daba lugar a una intolerancia a glucosa progresiva, pero sin generar resistencia a insulina (Guerra *et al.*, 2001). Los ratones transgénicos que carecen del IR en músculo (modelo MIRKO) no presentan cambios en el peso ni, sorprendentemente, en los niveles de insulina circulantes, aunque

sí aumenta el contenido graso (Brüning *et al.*, 1998). Otro modelo *knockout* tejido-específico que muestra resultados sorprendentes es el *knockout* del IR en las células β pancreáticas (β IRKO) (Kulkarni *et al.*, 1999). Estos ratones presentan un desarrollo normal de las células β pancreáticas aunque su capacidad para responder a los cambios en la concentración de glucosa se encuentra dañada, lo que indica el papel fundamental del IR como sensor de glucosa en las células β pancreáticas. En este caso concreto, el modelo *knockout* para el IGF-IR en estas mismas células (β IGFIRKO) presenta este mismo fenotipo, por lo que ambos receptores serían sensores fundamentales de glucosa (Kulkarni *et al.*, 2002; Xuan *et al.*, 2002). Sin embargo, sólo los ratones β IRKO muestran una disminución en la masa de célula β pancreática con la edad, lo que sugiere un papel clave del IR también en el mantenimiento de la masa de célula β pancreática adulta (Kulkarni *et al.*, 1999). De los modelos *knockout* para el IR específicos de tejido, la delección específica del IR en hígado (LIRKO) es el único que muestra una marcada resistencia a insulina e intolerancia a glucosa, destacando así el papel metabólico fundamental de este órgano. Sin embargo, el fenotipo se pierde con la edad, ya que los animales desarrollan displasia celular a partir de los dos meses de vida, la cual revierte además la hiperglucemia (Michael *et al.*, 2000).

1.3.2. La necesidad de los modelos *knockout* inducibles y específicos de tejido: modelo iLIRKO

Los modelos animales *knockout* globales o específicos de un tejido muestran que la función de una proteína es altamente dependiente del tejido en el que se expresa. Estas delecciones irreversibles ocurren

en el momento en el que la recombinasa Cre se expresa. En concreto, tal y como se ha descrito anteriormente, la resistencia a insulina se manifiesta de forma diferencial según el tejido. Sin embargo, otro factor crucial en la determinación del papel específico de una proteína es el momento en el que se deja de expresar, ya que muchas cuestiones acerca de los modelos de diabetes tipo 2 deben ser investigadas en modelos adultos y no durante el desarrollo. Esto es lo que sucede precisamente con el modelo LIRKO, en el que la falta del IR durante el desarrollo favorece la generación de una marcada displasia celular durante la edad adulta (Michael *et al.*, 2000). Por tanto, el control de la recombinasa debe ser espacial, bajo un promotor específico de tejido, y temporal, es decir, una recombinasa inducible. La fusión de la Cre con los dominios mutados de unión a ligando de los receptores de hormonas esteroideas (ER), permite una respuesta específica de la Cre quimérica a tamoxifeno exógeno, sin respuesta a ligandos endógenos (Leone *et al.*, 2003; Metzger y Chambon, 2001; Tannour-Louet 2002). Así, la inducción de la delección del IR por expresión de la Cre bajo el promotor de la albúmina, específico de hepatocitos, cuando el animal se ha desarrollado completamente, modelo iLIRKO, resulta fundamental para el estudio de los efectos derivados puramente de la resistencia a la insulina hepática.

1.3.3. Mecanismos de compensación: otros modelos *knockout*

Aunque en los animales *knockout* globales el organismo es capaz de compensar y enmascarar el fenotipo, como ocurre, por ejemplo, en los ratones sin IRS-1 (Araki *et al.*, 1994) o sin GLUT4 (Katz *et al.*, 1995), en los *knockout* específicos de tejido pode-

mos observar también este efecto, aunque a menor escala. Como se ha comentado anteriormente, IR e IGF-IR comparten cascada de señalización y muchos de sus efectos metabólicos o mitogénicos asociados. Al igual que ocurría con los ratones *knockout* para el IR global, los ratones *knockout* para el IGF-IR mueren al nacer, en este caso por fallo respiratorio. Además, presentan una deficiencia severa en el crecimiento (en torno al 45 % del tamaño normal) (Liu *et al.*, 1993). Sin embargo, los animales *knockout* para el receptor de IGF-I en hígado presentan un crecimiento y desarrollo normales (Yakar *et al.*, 1999). Conocer si existe una compensación entre el IR y el IGF-IR resulta fundamental para discernir los efectos metabólicos específicos de cada receptor.

2. RECEPTOR DE INSULINA E IGF-I

La insulina y el IGF-I controlan una amplia variedad de procesos biológicos a través de la acción de sus dos receptores tirosín quinasa: IR e IGF-IR (Boucher *et al.*, 2014). Aunque los principales tejidos diana son el hígado, el órgano adiposo y el músculo esquelético, la expresión del receptor de insulina se ha encontrado también en cerebro, corazón, riñón, alveolos pulmonares, acinos pancreáticos, endotelio vascular de la placenta, monocitos, granulocitos, eritrocitos y fibroblastos (Belfiore *et al.*, 2009). El IGF-IR se expresa también en músculo esquelético y órgano adiposo. De hecho, su presencia supera a la del IR en células del músculo liso y células endoteliales vasculares (Bäck *et al.*, 2011).

La activación de estos receptores inicia una cascada de fosforilaciones que permite la activación de numerosas enzimas

implicadas en el control del metabolismo y desarrollo. Tanto la vía de señalización de la insulina como la del IGF-I comparten numerosos puntos de control, que son regulados positiva o negativamente para asegurar una correcta duración e intensidad de la señal. Perturbaciones en estas vías de señalización dan lugar a resistencia a insulina (Boucher *et al.*, 2014).

2.1. ESTRUCTURA DE LOS RECEPTORES, ISOFORMAS DEL RECEPTOR DE INSULINA Y RECEPTORES HÍBRIDOS

El IR e IGF-IR son proteínas tetraméricas formadas por dos subunidades α extracelulares y dos subunidades β transmembrana unidas por puentes disulfuro. La porción extracelular de cada heterodímero $\alpha\beta$ del receptor está formada por 6 dominios, representados en la [Figura 4](#) (Menting *et al.*, 2013). Ambas subunidades se generan desde un único precursor mediante rotura proteolítica. Aunque son productos de dos genes diferentes, IR e IGF-IR derivan de un gen ancestral común, por lo que presentan un alto grado de homología ([Figura 5](#)) (Malaguarnera y Belfiore, 2011).

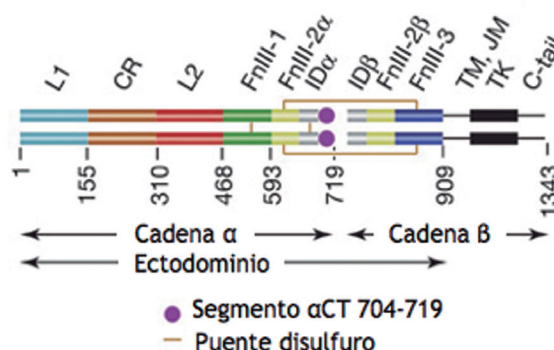


Figura 4. Estructura del receptor de insulina. CR: dominio rico en Cys; FnIII-1, FnIII-2, FnIII-3: dominios tipo fibronectina 1°, 2° y 3° respectivamente, ID: dominio de inserción; L1, L2: dominio rico en Leu 1° y 2° respectivamente, TK: Tyr quinasa, TM, JM: segmentos transmembrana y yuxtamembrana respectivamente. Figura adaptada de Menting *et al.*, 2013.

		Región αCT de las isoformas del receptor de insulina y el IGF-IR																																				
		IGF-IR																																				
IR-A	696	L	E	E	S	S	F	R	K	T	F	E	D	Y	L	H	N	V	V	F	V	P	R	P	S	719				
IR-B	696	L	E	E	S	S	F	R	K	T	F	E	D	Y	L	H	N	V	V	F	V	P	K	T	S	S	G	T	G	S	A	E	D	P	R	P	S	731
IGF-1R	683	K	E	E	A	E	Y	R	K	V	F	E	N	F	L	H	N	S	I	F	V	P	R	P	E	706				

Figura 5. Alineamiento de secuencias de las isoformas del receptor de insulina y el IGF-IR humanos. Los residuos conservados por los dos miembros de la familia de IR están subrayados en naranja. Los residuos recuadrados forman estructura helicoidal. Figura adaptada de Ward y Lawrence, 2009.

El RNA mensajero del IR sufre un *splicing* alternativo del exón 11 que da lugar a dos isoformas que difieren en la ausencia (isoforma A o IRA) o presencia (isoforma B o IRB) de 12 aminoácidos en el extremo carboxi-terminal de las cadenas α (α CT) del dominio de inserción (ID) (Figura 6) (Menting *et al.*, 2013). IRA se expresa predominantemente en tejidos fetales y en cerebro, presenta alta afinidad por IGF-II, aumenta su expresión en cáncer y, estudios previos en hepatocarcinomas humanos, cáncer de mama y cáncer de colon, relacionan la sobreexpresión de esta isoforma con el desarrollo de la patogénesis de esta enfermedad (Frasca *et al.*, 1999; Chettouh *et al.*, 2013); mientras que IRB casi se podría considerar un receptor específico de insulina y su expresión mayoritaria es en tejido adulto (Frasca *et al.*, 1999) (Figura 7). Concretamente, la expresión de IRB supone un 80 % de la expresión total de IR en el hígado (Belfiore *et al.*, 2009).

Las subunidades β del IR e IGF-IR contienen una amplia región citoplasmática con actividad tirosina quinasa. Esta región constituye el dominio más conservado entre IR e IGF-IR, con casi un 85 % de similitud en cuanto a la secuencia de aminoácidos. La región estructural y funcionalmente más divergente entre los dos receptores es el dominio citoplasmático carboxi-terminal de la cadena β (Malaguarnera y Belfiore, 2011).

Como consecuencia de la alta homología entre los dos receptores, se pueden formar receptores híbridos (HRs) compuestos por un dímero $\alpha\beta$ del IR (IRA o IRB) y otro dímero $\alpha\beta$ del IGF-IR (Figura 8). Su formación ocurre en tejidos que expresan ambos receptores y depende de los niveles de expresión relativa de cada tipo de receptor (Boucher *et al.*, 2014). A diferencia de otros receptores tirosina quinasa, cuya activación por ligando provoca la dimerización, IR e IGF-IR se encuentran en la superficie de la membrana como dímeros preformados (Benyoucef *et al.*, 2007). Además, IR, IGF-IR y HRs unen los mismos ligandos, aunque con afinidades muy diferentes, tal y como se resume en la Tabla 2 (Malaguarnera y Belfiore, 2011).

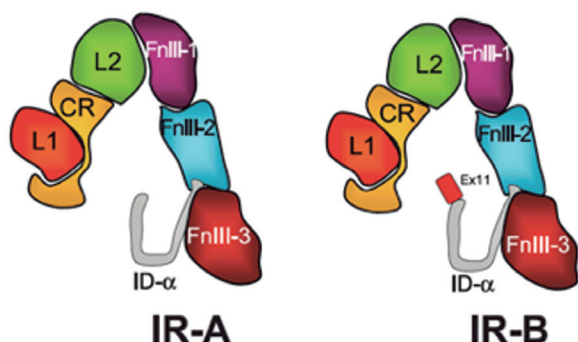


Figura 6. Diferencias estructurales entre la isoforma A y la isoforma B del receptor de insulina. Perspectiva de la estructura 3D de la subunidad α (dominios L1, CR, L2, FnIII-1/2) de cada isoforma del receptor de insulina y parte de la porción extracelular de la subunidad β (FnIII-3). El *loop* gris representa el dominio de inserción (ID- α). El fragmento representado en rojo del ID- α codificado por el exón 11 está presente en la isoforma B, pero no en la A (Belfiore *et al.*, 2009).

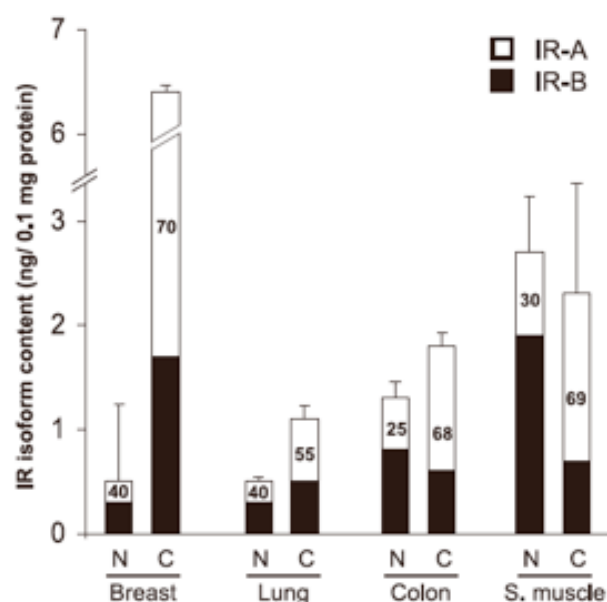


Figura 7. Presencia de cada isoforma del receptor de insulina en diferentes tipos de cáncer. Se compara la presencia de cada isoforma en tejidos cancerosos (C) en comparación con tejidos normales (N). En los tejidos, adquiridos mediante cirugía, se midió el contenido total de proteína por ELISA y la abundancia relativa de cada transcrito de cada isoforma del IR por RT-PCR (Belfiore *et al.*, 2009).

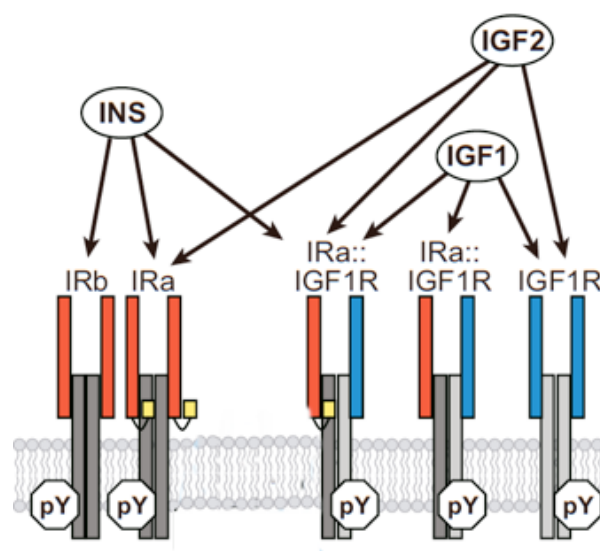


Figura 8. Unión de insulina, IGF1 e IGF2 a las isoformas del IR, IGF-IR y HRs que contienen IRA o IRB. Los diferentes ligandos no son capaces de unirse a todas las combinaciones de IR e IGF-IR, sino que lo hacen como se indica en la figura. La afinidad de unión viene detallada en la [Tabla 1](#). Figura adaptada de Taguchi y White, 2008.

<i>Knockout Insr</i>	Fenotipo	Referencias
Constitutivo	Cetoacidosis diabética	Accili <i>et al.</i> , 1996
Músculo	Dislipidemia	Brüning <i>et al.</i> , 1998
Músculo cardíaco	Tamaño de corazón reducido	Belke <i>et al.</i> , 2002
Músculo/tejido adiposo	Tolerancia a glucosa disminuida	Lauro <i>et al.</i> , 1998
Adipocitos	Protección frente a obesidad	Blüher <i>et al.</i> , 2002
Tejido adiposo marrón	Fallo célula β	Guerra <i>et al.</i> , 2001
Hígado	Moderada resistencia a insulina, hiperglucemia transitoria	Michael <i>et al.</i> , 2000
Célula β	Protección frente a la neovascularización inducida por hipoxia	Kulkarni <i>et al.</i> , 1999
Sistema nervioso central	Obesidad, subfertilidad	Bruning <i>et al.</i> , 2000

Tabla 2. Resumen de los diferentes *knockouts* específicos de tejido para el receptor de insulina. Figura adaptada de Nandi *et al.*, 2004.

2.2. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA Y EL IGF-I

Insulina e IGF-I presentan efectos diferenciales *in vivo* que dependen de la concentración de hormonas y de los niveles de expresión relativa de los receptores más que de la capacidad del IR o IGF-IR de transmitir una señalización diferente (Siddle, 2012). La unión del ligando a las subunidades α provoca un cambio conformacional que induce la activación de la actividad quinasa en las subunidades β . Esto resulta en una transfosforilación a lo largo de las subunidades β que permite el reclutamiento de los sustratos del receptor. Los sustratos mejor caracterizados son miembros de la familia de sustratos del receptor de insulina (IRS), hasta el momento han sido caracterizados 6

miembros de esta familia (desde el IRS-1 hasta el IRS-6) (White, 2006). Por ejemplo, la regulación del metabolismo de los carbohidratos y los lípidos, requiere de IRS-1 e IRS-2 (Copps y White, 2012). Las proteínas IRS se reclutan a la membrana por los receptores activados a través de los dominios de homología a la pleckstrina (PH) y los dominios de unión a fosfotirosina (PTB) (Voliovitch *et al.*, 1995) (Figura 9).

Aunque todos estos sustratos se fosforilan en residuos de Tyr, presentan claramente distintas funciones *in vivo*. Los ratones *knockout* para IRS-1 padecen retraso en el desarrollo y una cierta resistencia a insulina, especialmente en músculo; sin embargo, tienen tolerancia normal a la glucosa (Araki *et al.*, 1994). Los ratones *knockout* para IRS-2 exhiben un menor desarrollo

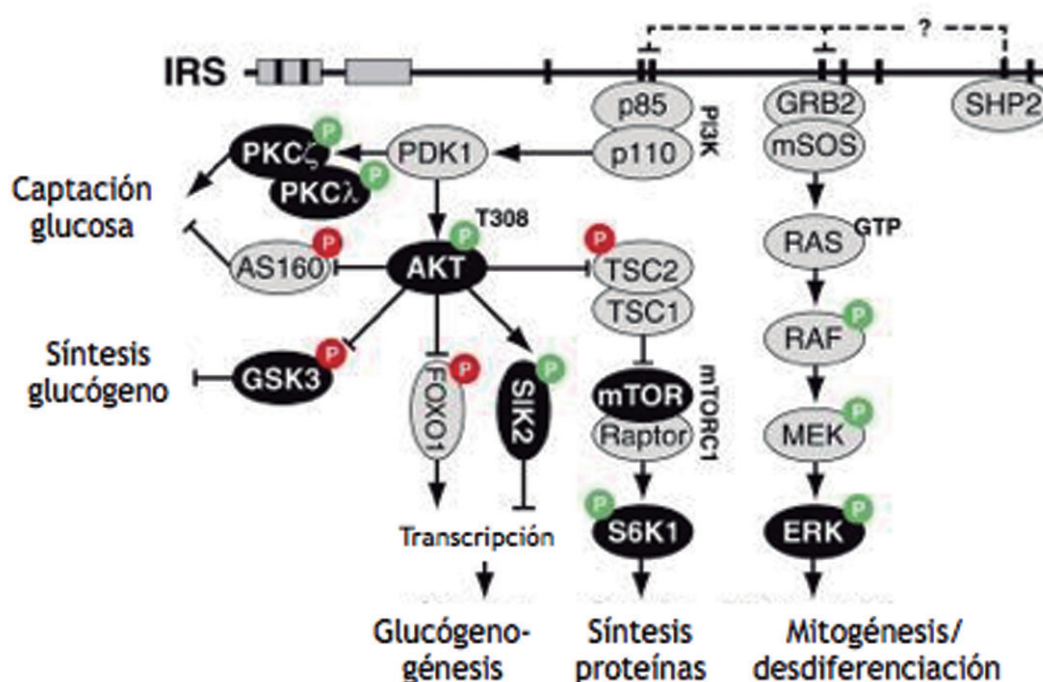


Figura 9. Mecanismos de señalización de la insulina y puntos de *feedback* iniciados por los IRS.

La fosforilación en Tyr de los IRS por la quinasa del IR permite la unión de los dominios SH2 de las proteínas p85, GRB2, SH2 y otras que no se muestran. Las señales metabólicas se consiguen gracias al reclutamiento de PI3K por los IRS, el cual estimula (Vía PDK1) la activación de los PKCs o PKB. En la ausencia de la fosforilación inhibitoria inducida por PKB, una serie de proteínas regulatorias clave: (1) regulan la captación de glucosa, (2) Inhiben la acumulación de glucosa como glucógeno (GSK3), (3) promueven la transcripción de genes gluconeogénicos (FoXO1) y bloquean la estimulación de la síntesis de proteínas por medio de la vía de señalización de mTORC1/S6K. Los IRS median también la activación de la cascada Ras/p42p44MAPK. Figura adaptada de Copps y White, 2012.

sólo en determinados tejidos como neuronas e islotes pancreáticos, pero presentan también una señalización defectuosa de insulina en el hígado que, en combinación con la pérdida de masa de célula β pancreática, desemboca en el desarrollo de diabetes (Whiters *et al.*, 1998). La delección de IRS-3 en ratones no resulta deletérea, a no ser que se combine con IRS-1, lo que provoca un defecto severo en la adipogénesis (Laustsen *et al.*, 2002). Los ratones *knockout* para IRS-4 muestran un mínimo retraso en el desarrollo e intolerancia a glucosa (Fantin *et al.*, 2003). Los sustratos IRS-5 e IRS-6 presentan una baja expresión y sólo en determinados tejidos, y no se conoce que desempeñen un papel fundamental (Cai *et al.*, 2003).

Al contrario que la fosforilación en Tyr de los IRS, la fosforilación en Ser/Thr puede regular positiva o negativamente. Numerosos mecanismos están implicados en defosforilar los residuos de tirosina de los IRS, disociarlos del IR, modificar su localización intracelular y regular su degradación (Copps y White, 2012).

2.2.1. Ruta PI3K/PKB

La ruta que une de forma crítica a las proteínas IRS con las acciones metabólicas de la insulina es la ruta de la PI3K y de la proteína quinasa B (PKB) (Figura 9). El reclutamiento y activación de PI3K depende de la unión a través de dos dominios de homología de Src tipo 2 (SH2) presentes en su subunidad reguladora (subunidad α) con las Tyr fosforiladas de los IRS (Shaw *et al.*, 2011). Esto resulta en la activación de la subunidad catalítica de la PI3K (subunidad β), que fosforilará rápidamente al fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato (PIP_2) para generar fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP_3).

Éste recluta a PKB a la membrana a través del dominio PH, donde se fosforila por la proteína quinasa dependiente de fosfoinosítidos tipo 1 (PDK1) e induce la correspondiente señalización. La isoforma β de la PKB (Akt2) es la más abundante en los tejidos sensibles a la insulina, y parece tener un papel fundamental como mediador de la acción de la insulina en el metabolismo (Boucher *et al.*, 2014). Además, el ratón *knockout* para PKB β es resistente a insulina y desarrolla diabetes, cosa que no ocurre con los *knockout* para las isoformas α (Akt1) o γ (Akt3) (Cho *et al.*, 2001). De la activación de PKB depende a su vez la activación, a través del complejo diana de rapamicina en mamíferos (mTOR), de p70S6 quinasa (p70S6K), la cual regula diversos factores implicados en la síntesis de proteínas (Belfiore *et al.*, 2009).

2.2.2. Ruta Ras/MAPK

La estimulación por insulina provoca la unión de las proteínas adaptadoras GRB2/SOS o SHP2 a los IRS (Figura 9). Esta unión conlleva a la activación de Ras y la correspondiente cascada dependiente de MAPK solo parcialmente, ya que otros sustratos pueden activarla (Copps y White, 2012). Ésta vía de señalización está implicada, fundamentalmente, en el crecimiento, supervivencia y diferenciación celular. Inicialmente se atribuyó una función similar a p44MAPK y p42MAPK, de hecho, p42MAPK es capaz de compensar la falta de p44MAPK en ratones *knockout* para esta proteína (Pagès *et al.*, 1999). Además, ambas isoformas están implicadas en la regulación negativa de los IRS a través de su fosforilación en Ser (Bouzakri *et al.*, 2003). Sin embargo, p44MAPK es esencial para la adipogénesis *in vivo* e *in vitro* y p42MAPK no es capaz de compensar en este caso (Taniguchi

et al., 2006). Por tanto, estas quinasas desempeñan un papel fundamental en las acciones de la insulina relacionadas con crecimiento y diferenciación celular, pero un papel secundario en cuanto a lo que al papel metabólico se refiere (Copps y White, 2012; Taniguchi *et al.*, 2006).

2.2.3. Modulación de la captación de glucosa en los hepatocitos

Los hepatocitos, junto con las células β , presentan un transporte de glucosa independiente de insulina, gracias al transportador de glucosa 2 (GLUT2). Una vez dentro de la célula, la isoforma VI de la hexoquinasa (HK, también denominada glucoquinasa), expresada en hígado y célula β , cataliza la fosforilación de la glucosa a glucosa-6-fosfato. La alta K_m (constante de Michaelis-Menten) de GLUT2 y glucoquinasa para la glucosa, aseguran que la captación y metabolización de ésta sea proporcional a la concentración sanguínea, permitiendo que la célula β actúe como sensor de los niveles de glucosa (Newgard *et al.*, 1990). La regulación del GLUT2 en el hígado está controlada de forma dosis dependiente en función de la concentración de glucosa, tanto en cultivo primario de hepatocitos de rata como en líneas celulares de hepatocitos (Burkhardt *et al.*, 2005). Además, la expresión hepática de GLUT2 disminuye durante los periodos de ayuno y recupera los niveles normales en el periodo de realimentación de ratas previamente ayunadas. En las ratas diabéticas, la expresión del GLUT2 se encuentra aumentada, pero regresa a niveles normales cuando las condiciones de hiperglucemia se corrigen tras la administración de insulina exógena (Burcelin *et al.*, 1992). La expresión diferencial de las isoformas del receptor de insulina regulan también la captación de

glucosa por GLUT2, ya que se ha descrito que la asociación de GLUT2 con IRA favorece este proceso en hepatocitos neonatales (Nevado *et al.*, 2006). Sin embargo, es desconocido el papel *in vivo* de las isoformas del IR en la diabetes tipo 2 y más concretamente en la regulación de la captación de glucosa hepática.

2.3. FUNCIÓN DEL HÍGADO EN EL CONTROL METABÓLICO

A pesar de los periodos de alimentación y ayuno, los niveles de glucosa en plasma se mantienen en un margen estrecho de entre 4 y 7 mM en individuos sanos. Este control preciso se consigue con el balance entre la absorción de glucosa por el intestino, la producción de glucosa por el hígado y su consumo y metabolismo por los tejidos periféricos (Saltiel y Kahn, 2001).

Concretamente, el hígado juega un papel clave en la homeostasia metabólica. Durante el ayuno, mantiene los niveles de glucemia liberando glucosa desde los depósitos de glucógeno (glucogenolisis). Cuando estos depósitos se agotan, tiene lugar la síntesis *de novo* de glucosa (gluconeogénesis), proceso que utiliza como sustratos aminoácidos, glicerol y lactato (Naïmi *et al.*, 2010). Si el periodo de ayuno persiste, el uso de la glucosa liberada por el hígado se limita a tejidos puramente glicolíticos, como el cerebro. Durante este periodo, otros tejidos dependen de la oxidación de ácidos grasos (β -oxidación) liberados por el tejido adiposo (Naïmi *et al.*, 2009). Por último, el hígado produce cuerpos cetónicos (cetogénesis) como último sustrato energético para el cerebro. Durante el periodo de alimentación, los depósitos de glucógeno se reponen (glucogenosíntesis) y la glucosa se utiliza para la producción de energía (glucolisis).

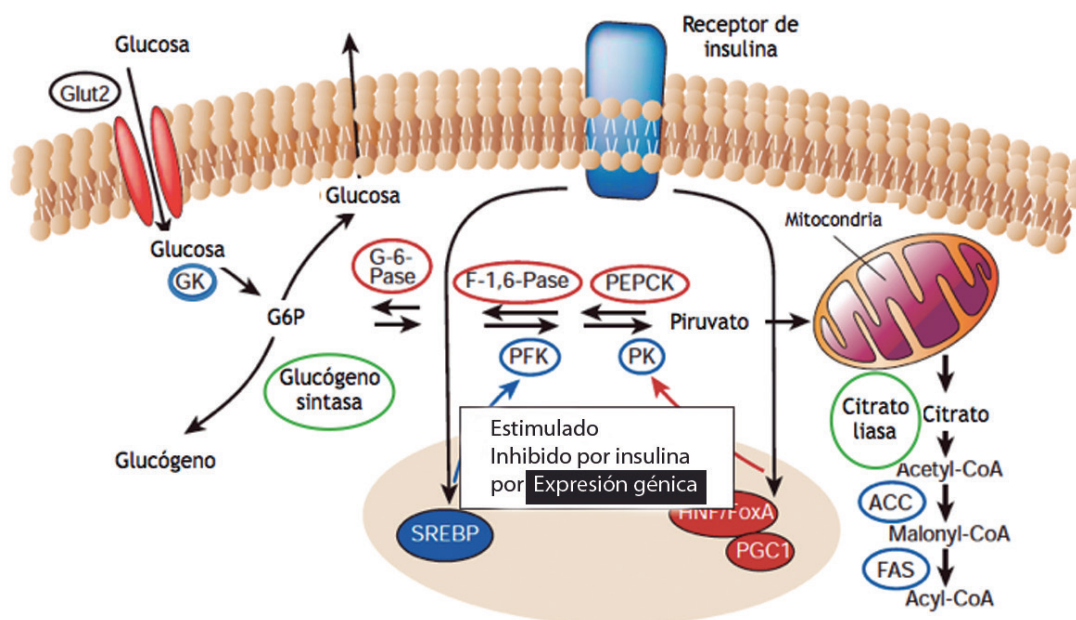


Figura 10. Regulación del metabolismo de la glucosa en el hígado.

En los hepatocitos, la insulina estimula el uso y almacenamiento de la glucosa en forma de lípidos o glucógeno, a la par que inhibe la síntesis y liberación de glucosa. Estos procesos se coordinan mediante una regulación coordinada entre la síntesis y la actividad enzimática. La insulina estimula la expresión de genes que codifican enzimas que intervienen en la síntesis de ácidos grasos (rodeadas en azul) a la vez que inhibe la expresión de enzimas gluconeogénicas (rodeadas en rojo). Estos efectos están mediados por una serie de factores de transcripción como SREBP, HNF-4 o factores de transcripción de la familia FoXO. La insulina regula también las actividades de varias enzimas (rodeadas en verde) a través de cambios en su estado de fosforilación. GK: glucoquinasa, G6P: glucosa-6-fosfato, G-6-Pase: glucosa-6-fosfatasa, F-1,6-Pase: fructosa-1,6-bisfosfatasa, PEPCK: fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, PFK: fosfofructoquinasa, PK: piruvato quinasa, ACC: acetil-CoA casboxilasa, FAS: sintasa de ácidos grasos. Figura adaptada de Saltiel y Kahn, 2001.

Tanto el exceso de glucosa como de ácidos grasos provenientes de la dieta se empaquetan en partículas lipoproteicas de muy baja densidad (VLDL) y se exportan al tejido adiposo (lipogénesis) (Naïmi *et al.*, 2009).

2.4. INTRODUCCIÓN AL METABOLISMO DEL GLUCÓGENO: REGULACIÓN POR GLUCOSA-6-FOSFATO

Como se acaba de describir, el hígado juega un papel central en el mantenimiento de la homeostasia glucídica por medio de la captación de glucosa durante la etapa postprandial, a través de la conversión a glucógeno o triglicéridos, y

mediante la producción de glucosa durante la etapa postabsortiva, a través de la glucogenólisis y la gluconeogénesis (von Wilamowitz-Moellendorff *et al.*, 2013). Si se producen defectos en los mecanismos por los cuales la glucosa y la insulina regulan el metabolismo hepático del glucógeno, la homeostasia glucídica se rompe, lo cual se asocia con enfermedades metabólicas como la diabetes tipo 2 (Roach *et al.*, 2012) (Figura 10).

El glucógeno es un polímero ramificado de monómeros de glucosa presente en la mayoría de los mamíferos, cuya función es actuar como almacén de carbohidratos. Los residuos de glucosa están unidos por enlaces $\alpha(1-4)$ a lo largo de la cadena y por enlaces $\alpha(1-6)$ en los puntos de ramificación (Agius, 2015) (Figura 11).

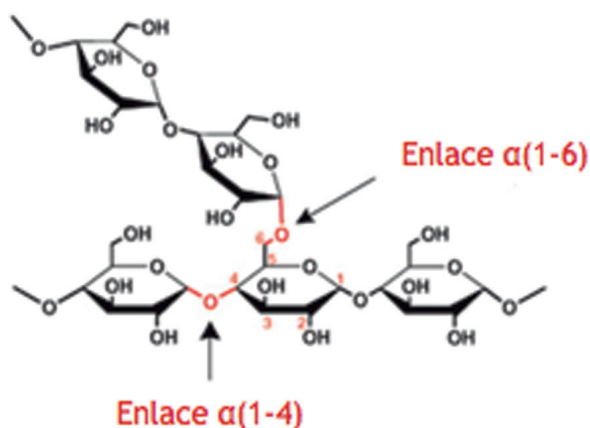


Figura 11. Enlaces que participan en la polimerización de las moléculas de glucógeno.
Figura adaptada de Roach *et al.*, 2012.

2.4.1. Glucógeno sintasa hepática

La enzima limitante en la síntesis de glucógeno es la glucógeno sintasa (GS) que cataliza la adición de unidades de glucosa desde la UDP-glucosa, mediante enlaces $\alpha(1-4)$, a la cadena en formación de glucógeno (Figura 12). En mamíferos existen dos isoformas de la GS, la muscular (codificada por *GYS1*) y la hepática (codificada por *GYS2*) (Roach *et al.*, 2012). La actividad de ambas isoformas está regulada por fosforilación en múltiples residuos y efectores alostéricos, de los cuales el más importante es la glucosa-6-fosfato (G6P) (Villar-Palasi y Guinovart, 1997). La G6P puede actuar como activador alostérico de la enzima fosforilada e incluso hiperfosforilada. La defosforilación de la GS también la activa y resulta en cambios en los parámetros cinéticos (von Wilamowitz-Moellendorf *et al.*, 2013) (Figura 13). Tras décadas de investigación intensiva en este campo, seguimos desconociendo en profundidad el control de la GS en hígado *in vivo* mediante su activación alostérica. Sin embargo, el mecanismo por el cual la insulina activa a la GS y aumenta el almacenamiento de glucógeno está bien descrito.

La insulina activa a PKB, la cual fosforila e inhibe a la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3) (Frame y Cohen, 2001; Doble y Woodgett, 2003). En ausencia de insulina, la GSK3 activa fosforila cuatro serinas en el extremo carboxi-terminal de la GS, lo que regula negativamente su actividad, disminuyendo la capacidad de sintetizar y almacenar glucógeno (Patel *et al.*, 2008).

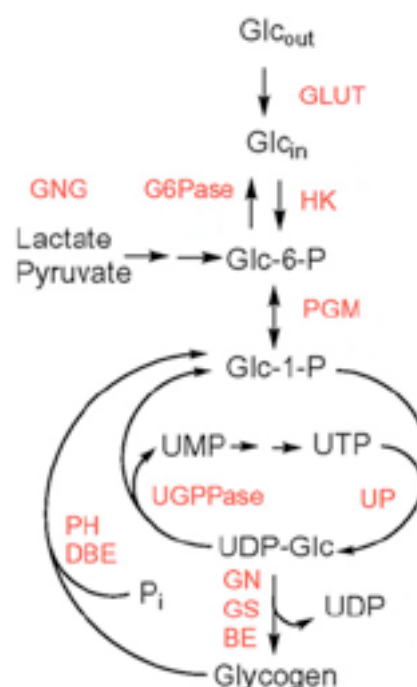


Figura 12. Esquema del metabolismo del glucógeno. Glc_{out}: glucosa extracelular; Glc_{in}: glucosa intracelular; HK: hexoquinasa; G6Pase: Glucosa-6-fosfatasa; PGM: fosfoglucomutasa; UP: UDP-glucosa pirofosforilasa; GN: glucogenina; GS: glucógeno sintasa; BE: enzima ramificadora; PH: glucógeno fosforilasa; DBE: enzima desramificadora; GNG: gluconeogénesis. Figura adaptada de Roach *et al.*, 2012.

2.4.2 Glucógeno sintasa quinasa 3

En mamíferos, la expresión de la GSK3 se regula por dos genes, *gsk3 α* y *gsk3 β* , que codifican para las dos isoformas de 51 y 47 kDa respectivamente (Medina y Wandosell, 2011). La diferencia de tamaño viene determinada por un dominio rico

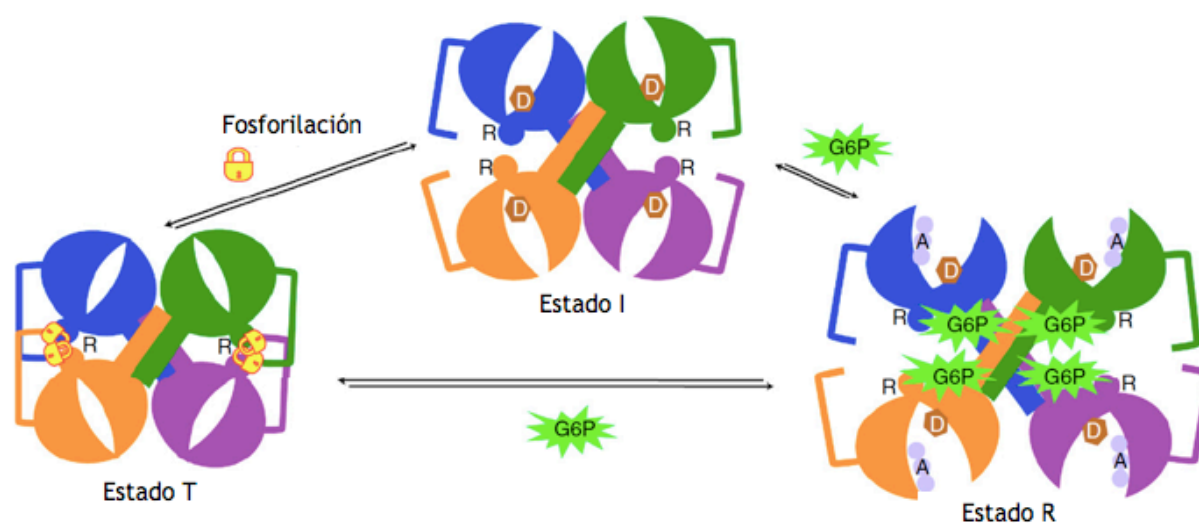


Figura 13. Representación esquemática de los diferentes estados de conformación que regulan la actividad de GYS2. Las subunidades están coloreadas de forma individual. R: hélices reguladoras que contienen Arg; A: aceptor de glucógeno. La fosforilación de la enzima en la Thr668 bloquea a ésta en el estado T. Se muestran los sitios de unión para la G6P en el estado R. Figura adaptada de Baskaran *et al.*, 2010.

en glicocola en el extremo amino-terminal de la GSK3 α (Doble y Woodgett, 2003). La eliminación de la isoforma GSK3 β en ratones da lugar a un fenotipo letal en la fase embrionaria (Hoeftlich *et al.*, 2000). Sin embargo, el *knockout* específico de hígado para esta isoforma presenta parámetros metabólicos normales (Patel *et al.*, 2008). Los ratones GSK3 α *knockout* mejoran la tolerancia a glucosa, aumentan la sensibilidad a insulina hepática y aumentan los depósitos de glucógeno en este órgano (MacAulay *et al.*, 2007).

La GSK3 tiene una preferencia inusual por proteínas diana que han sido previamente fosforiladas en un residuo *priming* localizado hacia el extremo carboxi-terminal del sitio de fosforilación de GSK3 α/β . La secuencia consenso en los sustratos de GSK3 es Ser/Thr-X-X-X-Ser-P/Thr-P, donde la primera Ser/Thr es el residuo diana a fosforilar, X es cualquier aminoácido y la última Ser-P/Thr-P es el sitio *pri-*

ming de fosforilación (Doble y Woodgett, 2003) (Figura 14). Más allá de su papel fundamental en el metabolismo, GSK3 interviene en procesos neurodegenerativos y cáncer (MacAulay *et al.*, 2007).

Sin embargo, la regulación por medio de insulina-PKB-GSK3 no resulta imprescindible para la síntesis de glucógeno tras la ingesta. McManus *et al.* generaron en 2005 el ratón *knockin* que expresa constitutivamente mutaciones en GSK3 en los residuos susceptibles de ser fosforilados por PKB, concretamente, GSK3 α (Ser 21) y GSK3 β (Ser 9), se sustituyeron por Ala. Sorprendentemente, estos animales presentan niveles normales de glucógeno. Además, como se ha comentado anteriormente, los ratones *knockout* para subunidad β o α hepáticas, de la GSK3 presentan también niveles de glucógeno normales tras la ingesta en ambos casos (Patel *et al.*, 2008; 2011).

2.4.3. Regulación específica por la Glucosa-6-fosfato

En el hígado, concentraciones elevadas de G6P intracelular se han propuesto como estímulo específico para la activación de la subunidad G_L de la GYS2 (von Wilamowitz-Moellendorff *et al.*, 2013). La GYS2 se desfosforila y activa por la proteína fosfatasa 1 (PP1) la cual se une y forma un complejo con la G_L . G_L interactúa con la forma activa de la glucógeno fosforilasa (GP_a), la cual antagoniza la activación de GS por medio de PP1- G_L . Cuando los niveles de glucosa en sangre se elevan, la glucosa se une a la GP_a hepática y estabiliza a la enzima en su conformación inactiva, GP_b. La glucogenólisis se para y la inhibición de la PP1- G_L se bloquea, permitiendo que la PP1- G_L defosforile y active a la GS, promoviendo así el almacenamiento de glucógeno en el hígado. Además, la G6P unida a la GYS2 convierte a la proteína fosforilada en un mejor sustrato para la PP1 (von Wilamowitz-Moellendorff *et al.*, 2013).

2.4.4. Degradación del glucógeno

En condiciones de ayuno, el glucógeno rápidamente se degrada para dar lugar a glucosa-1-fosfato (G1P) (Agius, 2015). Esta acción se cataliza por la enzima glucógeno fosforilasa la cual, en presencia de fosfato inorgánico (Pi), libera el residuo de glucosa terminal de las cadenas $\alpha(1-4)$ como G1P; y por la enzima desramificante, la cual transfiere una triosa desde el $\alpha(1-6)$ al $\alpha(1-4)$, para que la molécula de glucosa pueda ser liberada por la glucógeno fosforilasa (Agius, 2015). Existen tres isoformas de la glucógeno fosforilasa: PYGL, PYGM y PYGB, hepática, muscular y cerebral respectivamente. Las tres isoformas se regulan de forma alostérica por la unión

de diversos metabolitos, por acetilación y por fosforilación covalente en la Ser 14. La forma fosforilada y desfosforilada se denominan GP_a y GP_b respectivamente. La glucógeno fosforilasa baila en un equilibrio de estados conformacionales que son: conformación activa (estado-R) o inactiva (estado-T). El estado-R presenta alta afinidad por los sustratos, glucógeno y Pi. La fosforilación en Ser 14 y la unión de AMP favorecen el estado-R, mientras que la unión de G6P, ATP o fructosa-1-fosfato (F1P) estabilizan el estado-T. La unión de AMP o G6P es mutuamente excluyente ya que se unen a los mismos residuos. Además, la glucosa promueve la conversión de GP_a a GP_b lo que implica que, cuando los niveles de GP_a disminuyen hasta un determinado umbral, la GS se activa por defosforilación (Stalmans *et al.*, 1997).

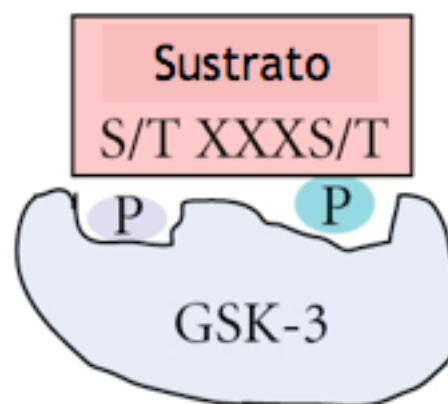


Figura 14. La selectividad de la GSK3 por sus sustratos viene determinada por la existencia de un residuo *priming* fosforilado previamente. Figura adaptada de Medina y Wandosell 2011.

3. PAPEL DE LA CÉLULA β PANCREÁTICA EN LA HOMEOSTASIA METABÓLICA. PLASTICIDAD DE LA MASA DE CÉLULA β PANCREÁTICA

Las células β pancreáticas son las encargadas de sintetizar y secretar la hormona insulina, esencial para mantener la homeostasis metabólica. La función más importante de estas células es la secreción de insulina en respuesta al estado nutricional del organismo (Holst y Gromada, 2004). El papel clave de la hipertrofia celular en la dinámica de la masa de célula β a lo largo de la vida fue descrito en ratas por Montanya *et al.* en el año 2000. Su estudio demostró que tanto la hipertrofia como la hiperplasia son responsables del aumento de masa de célula β en animales jóvenes. Sin embargo, en la población adulta, la hipertrofia cobra un papel principal. Estas observaciones permitieron conciliar los estudios que demuestran el aumento de masa de célula β en adultos (Butler *et al.*, 2003), con los ya descritos que hacen hincapié en la baja proliferación tras la juventud, poniendo de relieve la especial relevancia de la hipertrofia de célula β . Son diversos los estudios que demuestran la alta plasticidad de la masa de célula β en diversas condiciones. Por ejemplo, el embarazo supone un aumento de la demanda de insulina, lo cual resulta, entre otros cambios adaptativos, en un aumento del número y volumen de células β (Sorenson y Brelje, 1997). La compensación ante situaciones patológicas,

como la resistencia a la insulina sistémica observada en el modelo nulo heterocigoto para el IR e IRS-1, es capaz de producir un aumento de hasta 15-20 veces en la masa de célula β y en la secreción de insulina (Brüning *et al.*, 1998). Otros modelos clásicos de aumento compensatorio de masa de célula β incluyen los animales carentes de leptina (*ob/ob*) (Edvell y Lindström, 1995) o de su receptor (*db/db*) (Chick y Like, 1970). Ambos son modelos de obesidad por hiperfagia que acaban desarrollando diabetes debido a pérdida de la masa de célula β .

3.1. APOPTOSIS EN LAS CÉLULAS β PANCREÁTICAS

Es importante mencionar la apoptosis como mecanismo fisiológico para el mantenimiento de la masa de célula β . Si la finalidad de los mecanismos que conllevan a una mayor masa de célula β es el aumento de los niveles de insulina, una subsiguiente disminución de la demanda de la hormona debe de ir acompañada de reducción de la masa de célula β . En estos casos, una reducción deficiente de la masa de célula β podría llevar a hipoglucemia, potencialmente letal. Por lo que de forma fisiológica, siguiendo al aumento de masa de célula β observado durante el embarazo, la masa disminuye por muerte celular programada tras el parto (Scaglia *et al.*, 1995). De igual manera, la apoptosis de célula β participa de forma fisiológica en la remodelación del islote en neonatos (Scaglia *et al.*, 1997). La apoptosis como proceso responsable de la disminución de la masa de célula β en la diabetes tipo 2 se identificó por primera vez en ratas obesas Zucker. En estos animales, la masa de célula β se incrementa dramáticamente para hacer frente a la resisten-

cia a insulina provocada por la obesidad. Pero, al aumentar el peso de los animales y agudizarse la resistencia a la hormona, la función y masa de la célula β acaban decayendo. Esto no es debido a una falta de proliferación o neogénesis, sino a un aumento de la apoptosis, tal y como se observó en las secciones de tejido pancreático (Pick *et al.*, 1998). En humanos también se ha comprobado que el mecanismo que lleva a una pérdida de masa de célula β es la apoptosis. En un estudio a partir de muestras de autopsias, se comprobó que los pacientes obesos con intolerancia a glucosa mostraban una pérdida de hasta el 40 % de la masa de célula β y, en individuos que desarrollaron diabetes, el porcentaje aumentaba hasta el 60 %. No se encontraron diferencias en cuanto a los niveles de proliferación, que fueron bajos en todos los casos. Sin embargo, la apoptosis cuantificada por TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*), resultó mayor en los pacientes diabéticos (Butler *et al.*, 2003).

La apoptosis es el mecanismo final encargado de la disminución de la masa de célula β , pero las causas que desencadenan apoptosis son múltiples: acumulación de proteínas defectuosas, estrés del retículo endoplásmico (RE), autofagia o el propio efecto glucotóxico (Bartolomé A, 2012).

3.2. EFECTO GLUCOTÓXICO EN LAS CÉLULAS β PANCREÁTICAS

La glucotoxicidad puede definirse como el daño causado por exposición crónica a concentraciones suprafisiológicas de glucosa que, en islotes, puede llevar a una disminución de función y a la apoptosis. Dependiendo de la especie estudiada, el

efecto “glucotóxico” es diferente, mientras que los islotes humanos son muy sensibles a concentraciones de glucosa por encima de 5.6 mM (Leibowitz *et al.*, 2001; Maedler *et al.*, 2001), los islotes murinos son más resistentes o incluso están protegidos por concentraciones de glucosa más elevadas (Hoorens *et al.*, 1996). La glucosa en célula β puede ejercer su potencial efecto negativo a través de diferentes mecanismos (Robertson, 2004). La mayoría de los estudios se han llevado a cabo *in vitro*, con líneas celulares, o *ex vivo*, en islotes, por lo que sería especialmente interesante un estudio en profundidad *in vivo*.

La posibilidad de que la propia hiperglucemia pudiese acelerar la muerte de las células β remanentes en animales diabéticos no ha sido tratada convenientemente. Sin embargo, hay evidencias que indican que podría ser todo lo contrario ya que, tras inducción de diabetes por la estreptozotocina, los animales presentan células β hiperproliferativas de manera dependiente de hiperglucemia (Pechhold *et al.*, 2009).

Varios autores coinciden en que parte del papel nocivo de la glucosa puede estar causado por aumento de estrés del RE. Estudios *in vitro* demuestran cómo, en principio, concentraciones altas de glucosa de manera crónica aumentan la síntesis de proinsulina por parte del RE. Pero, finalmente, se produce estrés de RE y disminución de síntesis de proinsulina (Lipson *et al.*, 2006).

4. EJE DE COMUNICACIÓN HÍGADO-PÁNCREAS

El principal objetivo de la terapia de la diabetes en cuanto a la célula β es la identificación de nuevos factores que promuevan su regeneración, con el objetivo final de aumentar la masa de célula β en pacientes con diabetes tipo 1 ó 2. Como se ha comentado anteriormente, las células β tienen la capacidad de compensar en dos casos diferentes de resistencia a insulina: fisiológica (embarazo) o resistencia a insulina patológica (obesidad) (Van Assche *et al.*, 1978; El Ouaamari *et al.*, 2013). El crecimiento de la masa de célula β tanto en humanos como en roedores ocurre por la propia duplicación de las células β ya existentes (Meier *et al.*, 2008; Teta *et al.*, 2007), aunque se han descrito factores de crecimiento putativos que median en este proceso, especialmente en el contexto de resistencia a insulina. Varias moléculas producidas por el hígado se han postulado como candidatas para participar en este proceso, como la conflictiva betatrofina (Yi *et al.*, 2013; Gusarova *et al.*, 2014; Abu-Farha *et al.*, 2015; Cox *et al.*, 2015), el factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21) (Emanuelli *et al.*, 2014) o el IGF-I (Escribano *et al.*, 2009). Recientemente se ha descrito a la serpina B1 como uno de estos factores (El Ouaamari *et al.*, 2016), apoyando así la teoría que defiende la existencia de un eje de comunicación hepato-pancreático, descrito ya previamente (Escribano *et al.*, 2009; El Ouaamari *et al.*, 2013). Este campo debe explorarse todavía a fondo para poder identificar factores adicionales que puedan regularse/administrarse, por sí mismos o combinados, con el objetivo final de poder restablecer la normoglucemia en pacientes diabéticos.

5. DESREGULACIONES EN EL METABOLISMO LIPÍDICO ASOCIADOS A DIABETES TIPO 2

Aunque todas las formas de la diabetes se caracterizan por la hiperglucemia incontrolada, otros parámetros hormonales se encuentran frecuentemente desregulados y contribuyen a la patología de la enfermedad. Estos parámetros incluyen insulina, glucagón, triglicéridos, etc. Por ejemplo, un acúmulo anormal de lípidos se ha asociado con una disminución de la sensibilidad a la insulina (Neubauer y Kulkarni, 2006). La interacción entre la glucosa y el metabolismo lipídico no está totalmente caracterizada: el papel que juegan el IR y el IGF-IR en la dislipidemia asociada a la diabetes tipo 2 se desconoce. Lo que sí está completamente establecido es una relación directa entre la diabetes tipo 2 y un aumento de triglicéridos en plasma, la disminución de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y un aumento de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Neubauer y Kulkarni, 2006). En concreto, la lipogénesis, la cual se regula positivamente por insulina, está aumentada en situaciones de diabetes tipo 2 (Biddinger *et al.*, 2008). Esto podría ser porque la lipogénesis se mantiene dirigida por la insulina pero de forma excesiva, debido a la hiperinsulinemia que se produce en estados de resistencia a insulina (Biddinger *et al.*, 2008). Otra opción es que la lipogénesis se mantenga resistente a insulina, pero sea dirigida también por otros factores, como una excesiva ingesta de carbohidratos (Schwarz *et al.*, 2003). Una tercera opción, descrita recientemente por Cook *et al.*, es la idea de la resistencia a insulina selectiva en hepatocitos, capitaneada por PKB/factores de transcripción Forkhead

Apolipoproteínas	Fuente primaria	Asociación lipoproteína	Función
Apo A-I	Hígado Intestino	HDL, quilomicrones	Proteína estructural de las HDL Activador LCAT
Apo A-II	Hígado	HDL, quilomicrones	Proteína estructural de las HDL Activador de la lipasa hepática
Apo A-IV	Intestino	HDL, quilomicrones	Deconocida
Apo A-V	Hígado	HDL, quilomicrones, VLDL	Lipólisis de TG
Apo B-48	Intestino	Quilomicrones	Proteína estructural de los quilomicrones
Apo B-100	Hígado	VLDL, LDL	Proteína estructural Ligando del receptor de LDL
Apo C-I	Hígado	HDL, quilomicrones, VLDL	Activa LCAT
Apo C-II	Hígado	HDL, quilomicrones, VLDL	Cofactor del LPL
Apo C-III	Hígado	HDL, quilomicrones, VLDL	Inhibe LPL
Apo E	Hígado	HDL, quilomicrones remanentes	Ligando del receptor de LDL

Tabla 3. Tabla resumen de las apolipoproteínas y sus funciones.
Tabla adaptada de Feingold y Grunfeld, 2015.

(FoxO) hacia la producción de glucosa hepática (HGP), y por PKB/ proteína de unión a elementos regulados por esteroles 1c (SREBP-1c) hacia la lipogénesis *de novo* (DNL).

El colesterol y los triglicéridos son de carácter apolar y, por tanto, deben ser transportados en sangre asociados a proteínas. Las lipoproteínas son partículas complejas, con un núcleo central de colesterol y triglicéridos rodeado de colesterol libre, fosfolípidos y apolipoproteínas. Además de su función estructural, las apolipoproteínas actúan como ligandos para los receptores de lipoproteínas, dirigen la formación de las vesículas y actúan como activadores o inhibidores de las enzimas implicadas en el metabolismo de las lipoproteínas. Las lipoproteínas plasmáticas se dividen en siete clases en función de su tamaño, composición lipídica y las apolipoproteínas que las integran, las cuales se

resumen en la [Tabla 3](#) (Feingold y Grunfeld, 2015).

La vía exógena de las lipoproteínas comienza con la incorporación de los lípidos procedentes de la dieta a los quilomicrones del intestino. Los triglicéridos y colesterol son transportados por los quilomicrones que se metabolizan en tejidos periféricos por la lipoproteína lipasa (LPL), dando lugar a los quilomicrones remanentes. Los quilomicrones remanentes son ricos en colesterol y se captan por el hígado (Feingold y Grunfeld, 2015).

La vía endógena de las lipoproteínas comienza en el hígado con la formación de las VLDL. Cada molécula de VLDL contiene una molécula de Apo B-100. Cuando aumenta la producción de triglicéridos en el hígado, las partículas VLDL que secreta son de mayor tamaño. Los triglicéridos transportados por estas partículas se

metabolizan en el músculo y en el tejido adiposo por la LPL, dando como resultado las partículas IDL. Éstas se convierten a LDL, ricas en colesterol, tanto que transportan la mayoría de colesterol que se encuentra en circulación. Cada partícula de LDL contiene una molécula de Apo B-100 que es reconocida por el receptor de LDL, expresado en diversos tejidos. La mayoría de estas partículas las capta el hígado. El número de receptores de LDL en la membrana depende del contenido de colesterol en la célula, es decir, si éste disminuye, aumenta el número de receptores para incrementar así la captación. Las partículas de LDL de pequeño tamaño se asocian con hipertrigliceridemia y diabetes tipo 2. Además se consideran proaterogénicas ya que permanecen mayor tiempo en circulación por varios motivos: tienen menor afinidad por el receptor LDL, entran mejor en la pared arterial y son más susceptibles de ser oxidadas (Feingold y Grunfeld, 2015).

El transporte reverso del colesterol comienza con la formación de las partículas nacientes de HDL por el hígado, las cuales juegan, en principio, un papel antiaterogénico (Figura 15). Apo A-I forma su núcleo estructural proteico y, cada una de estas partículas, posee múltiples moléculas de Apo A-I. Las partículas nacientes de HDL pueden captar colesterol y fosfolípidos de otras células, proceso mediado por el transportador dependiente de la unión a ATP, familia A, miembro 1 (ABCA1); por el transportador dependiente de la unión a ATP, familia G, miembro 1 (ABCG1) o por el *scavenger* receptor, clase B, miembro 1 (SRB1) para dar lugar así a las partículas maduras de HDL. El colesterol movilizado desde otras células es colesterol libre que se localiza en la superficie de las partículas de HDL. Para poder generar partículas de HDL maduras, con un núcleo de colesterol, el colesterol de la superficie debe ser esterificado. Para ello, la lecitina colesterol aciltransferasa (LCAT) cata-

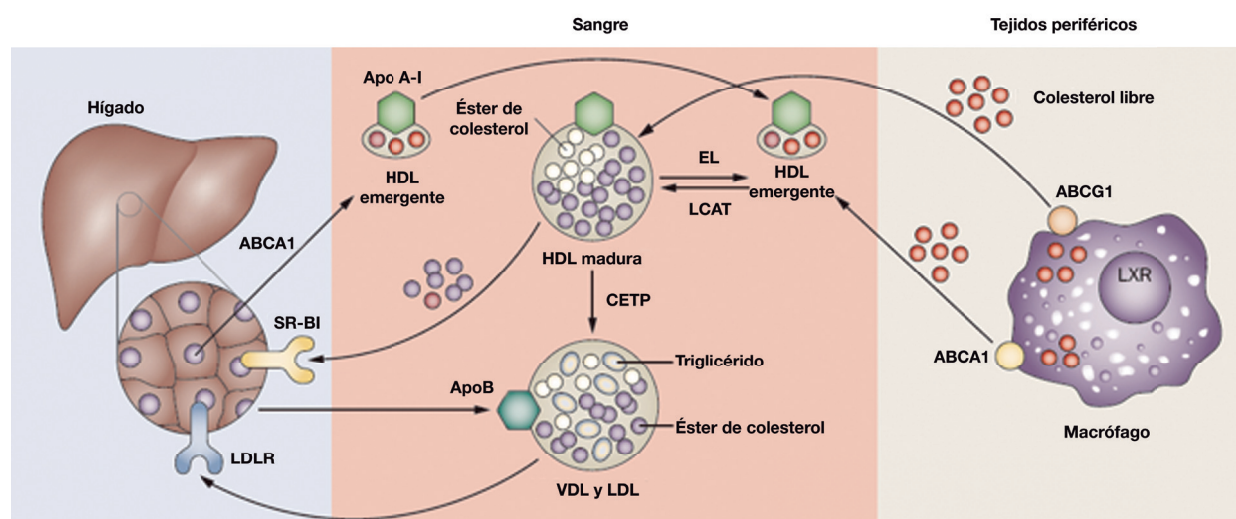


Figura 15. Metabolismo de las partículas HDL y transporte reverso del colesterol.

El hígado secreta proteínas ApoA-I pobres en lípidos, las cuales adquieren rápidamente colesterol por medio del transportador ABCA1 presente en hepatocitos. Estas partículas promueven la entrada de colesterol libre desde los macrófagos a través del transportador ABCA1. LCAT esterifica el colesterol libre a ésteres de colesterol para formar las partículas HDL maduras, lo cual promueve el flujo de colesterol desde los macrófagos vía ABCG1, así como desde otros tejidos periféricos por mecanismos a fecha de hoy no del todo conocidos. En macrófagos, ABCA1 y ABCG1 están regulados por LXR. Las partículas maduras de HDL pueden transferir su colesterol al hígado directamente vía SR-B1 o indirectamente por la vía mediada por CETP de transferencia a lipoproteínas que contienen ApoB, con la subsecuente captación de éstas a través del receptor LDL. El colesterol hepático puede ser excretado directamente a la bilis como colesterol o tras su conversión a ácidos biliares, a no ser que sea absorbido en el intestino y se secrete entonces por las heces. Figura adaptada de Duffy y Rader 2009.

liza el proceso de transferencia de ácidos grasos provenientes de los fosfolípidos al colesterol libre. Esta enzima está asociada a las partículas de HDL. Las HDL maduras devuelven el colesterol principalmente al hígado por su interacción con el receptor SRB1. La partícula de HDL se une a SRB1 y el colesterol se transporta al interior del hígado, sin la internalización de ésta. En humanos, ya que poseen la proteína que transfiere los ésteres de colesterol (CETP), podría volver también a las partículas de VLDL (Feingold y Grunfeld, 2015). Los ratones deficientes en SRB1 presentan un aumento significativo en los niveles de colesterol en las partículas HDL. Además, el transporte reverso de colesterol está reducido en estos animales (Trigatti *et al.*, 1999).

6. TERAPIA GÉNICA CON VIRUS ADENOASOCIADOS

La terapia génica consiste en la introducción de material genético ajeno en las células con un fin terapéutico. Este proceso se realiza gracias a la ayuda de los vectores, los cuales permiten el acceso del gen al entorno intracelular y lo protegen de su degradación. Cada caso requiere del uso de un vector y transgén concretos, que se seleccionan de acuerdo a la estrategia terapéutica que se va a utilizar. Para ello existen dos tipos de estrategias: terapia génica *in vivo*, la cual consiste en la liberación directa de los vectores en los tejidos o en sangre y terapia génica *in vitro*, donde las células se aíslan de pacientes para ser modificadas *in vitro* y se trasplantan de nuevo al mismo individuo (González-Aseguinolaza y Prieto, 2011).

En nuestro caso, para introducir las isoformas del IR en los ratones iLIRKO, optamos por el abordaje *in vivo*, utilizando como vehículos los virus adenoasociados (AAVs).

6.1. DESCRIPCIÓN DE LOS VIRUS ADENOASOCIADOS

6.1.1. Vector viral

Los virus adenoasociados son virus de DNA de cadena simple, cuyo genoma es de aproximadamente 4.7 kb de longitud. Forman parte del género de los *Dependovirus*, perteneciente a la familia de los *Parvoviridae* (Wu *et al.*, 2010). Para su replicación es necesaria la coinfección con un virus ayudante, generalmente adenovirus o herpes simplex virus (Wu *et al.*, 2006, 2010). En ausencia de un virus ayudante, los AAVs establecen una infección latente en la célula permaneciendo en forma episomal, ya que su integración en sitios específicos del genoma resulta ineficiente (McCarty *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2006). Los vectores recombinantes derivados de los AAVs son atractivos para el desarrollo de terapias humanas porque mantienen una expresión génica a largo plazo en diversos tejidos y, a pesar de su alta seroprevalencia, no se conoce ninguna patología en humanos causada por ellos (Arruda *et al.*, 2007; Gonçalves, 2005; Raupp *et al.*, 2012; Vance *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2010). Además, generalmente presentan una baja inmunidad y existe una gran riqueza de serotipos disponibles con diferente tropismo tisular (Raupp *et al.*, 2012).

Su DNA genómico de aproximadamente 5 kb está constituido por los ITRs, que flanquean a los dos genes virales *rep* (replicación) y *cap* (cápside) los cuales codifican proteínas no estructurales y estructurales respectivamente (Gonçalves, 2005).

Una limitación sustancial de los vectores de los AAVs es su reducida capacidad de empaquetamiento, restringida a vectores menores de 5 kb, independientemente del serotipo, ya que su límite de empaquetamiento viene definido por el tamaño del genoma del AAV *wildtype*. El empaquetamiento de vectores genómicos con un tamaño superior a 5 kb resulta heterogéneo en cuanto a longitud, ya que parte del extremo 5' se pierde (Wu *et al.*, 2010).

6.1.2. Serotipos virales: tropismo celular

Hasta la fecha, un gran número de serotipos y más de 100 variantes de AAVs han sido aisladas de stocks de adenovirus o de tejidos humanos o de primates no humanos **Figura 16** (Vance *et al.*, 2015). Teóricamente, la capacidad para generar un pseudoserotipo de AAV recombinante se conseguiría combinando, bien la cápside, bien las secuencias de DNA (ITRs) de diferentes serotipos de AAVs, lo que permitiría la creación de un número ilimitado de nuevos vectores (Arruda *et al.*, 2007). La utilización de otros serotipos no sólo podría disminuir la carga viral, si potencialmente tuviese una eficiencia de transducción mayor, sino que ayudaría a evadir anticuerpos neutralizantes preexistentes generados a causa de una infección natural o un tratamiento previo basado en la administración de AAVs (Wu *et al.*, 2006).

6.2. RESPUESTA INMUNE FRENTE A LOS VIRUS ADENO-ASOCIADOS

En diversos ensayos clínicos se ha generado respuesta inmune humoral y linfocitos T CD8⁺ de memoria. Para sortear esta cuestión, se han aislado numerosas variantes de las cápsides de primates no humanos, las cuales se caracterizan por presentar mayor porcentaje de transducción en algunos de los tejidos y, potencialmente, una menor seroprevalencia, ya que se disminuye la probabilidad de una respuesta inmune preexistente frente a esa cápside (Vance *et al.*, 2015). Además, se han explorado diversas modificaciones en la cápside para mejorar la eficiencia de transducción y la llegada al tejido diana (Raupp *et al.*, 2012) como, por ejemplo, generar cápsides mediante la inserción de péptidos ligando o, partiendo de serotipos ya existentes como molde, generar virus quimera o mosaicismos (McCarty *et al.*, 2004). El reconocimiento de diversos epítopos de los AAVs por los linfocitos T podría evitarse variando los serotipos. Sin embargo, en el caso del AAV2, el serotipo más común, los linfocitos T de memoria que reconocen su cápside podrían reconocer también epítopos derivados de otros serotipos, como consecuencia de la alta homología en la secuencia entre el AAV2 y otros serotipos (Arruda *et al.*, 2007). A pesar de ello, los vectores AAV2 recombinantes han sido probados en estudios preclínicos para diversas enfermedades como hemofilia, deficiencia en α 1-antitripsina, fibrosis quística o distrofia muscular de Duchenne obteniéndose resultados positivos (Vance *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2006).

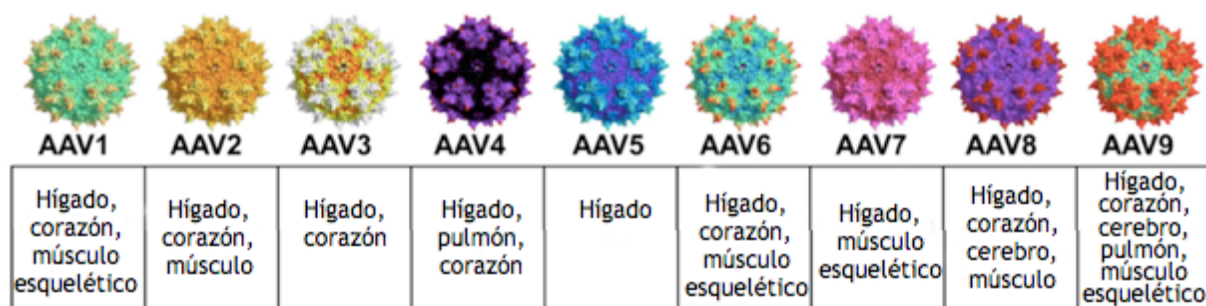


Figura 16. Enfermedades tratadas en animales con AAVs de distintos serotipos. Los ensayos incluyen primates no humanos, cerdos, gatos, perros, conejos y ovejas. Figura adaptada de Vance *et al.*, 2015.

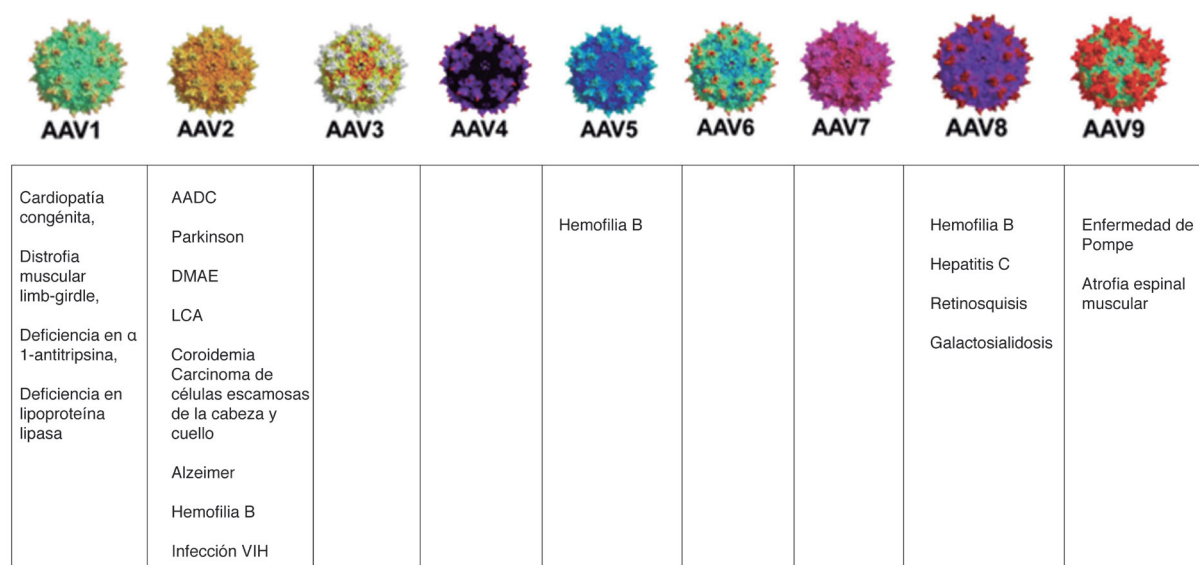


Figura 17. Enfermedades que estaban siendo testadas a fecha de Julio de 2015 (últimos datos publicados) según el serotipo del AAV ensayado. AADC: déficit aromático descarboxilasa de L-aminoácidos; DMAE: degeneración macular asociada a la edad; LCA: amaurosis congénita de Leber. Figura adaptada de Vance *et al.*, 2015.

6.3. CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS ADENOASOCIADO SEROTIPO 8

Uno de los AAVs aislado y caracterizado más prometedor es el AAV8, ya que tiene una eficiencia de transfección en el hígado superior a la del serotipo 2 (Raupp *et al.*, 2012). Debe tenerse en cuenta que el AAV8 en dosis elevadas no sólo transduce de forma eficiente al hígado, sino a otros órganos como el músculo esquelético. (Nakai *et al.*, 2005). El uso de la luci-

ferasa como transgén, permite evaluar la actividad de la proteína transgénica tras una inyección intraperitoneal de su sustrato (luciferina) en el mismo animal y de forma secuencial, de modo que se puede conocer el tropismo viral (Zincarelli *et al.*, 2008). Además, si se genera un vector con un promotor hepatoespecífico que confiera especificidad adicional, en conjunto con las proteínas de la cápside del AAV8, se disminuye la respuesta inmunitaria ya que sortea la expresión en los macrófagos residentes en el hígado, o células de Kupffer (Sands, 2011). Por ejemplo, los AAV8

se han utilizado recientemente en ensayos clínicos para expresar el factor de coagulación IX en hígados humanos con resultados positivos (Raupp *et al.*, 2012). La falta de este factor se conoce también como hemofilia B, y se caracteriza principalmente por las hemorragias incontroladas. En la **Figura 17** se resumen las enfermedades que estaban siendo testadas a fecha de Julio de 2015 (últimos datos publicados) en función del serotipo del AAV ensayado.

6.4 ENSAYOS CLÍNICOS EN MARCHA CON VIRUS ADENOASOCIADOS

Los datos referentes a los ensayos clínicos en marcha se encuentran recogidos en la página web perteneciente al NIH clinicaltrials.gov, y han sido publicados recientemente por Vance *et al.*, en 2015. Según el NIH, 137 ensayos clínicos con AAVs se han llevado a cabo desde su descubrimiento en 1960, a fecha de julio del 2015 (última fecha de actualización de los datos de esta página web). Estos ensayos conforman el 6.2 % del total de los ensa-

yos clínicos con terapia génica. Tradicionalmente, el serotipo más usado ha sido el AAV2. Sin embargo, su uso entre los años 2010 y 2015 se ha reducido casi a la mitad (89 % vs. 54 %). En 2015, serotipos menos comunes han aumentado su presencia en estos ensayos respecto al 2010, **Figura 18**. Por ejemplo, el número de estudios que han utilizado el AAV8 asciende de 2 en 2010 a 7 en 2015 (Vance *et al.*, 2015).

Como muestra la **Figura 19**, en 2010 un 62 % de los ensayos clínicos con AAVs estaban en fase I y, sólo un 17 % de los estudios del mismo ensayo, en fases I y II. En 2015, los estudios sólo en fase I se redujeron un 20 % y aumentaron los de fase I y II, probablemente debido al alto coste que genera el desarrollo de un ensayo clínico. Además, el número de estudios en fase III se redujeron, ya que las terapias con resultados favorables empezaron a salir al mercado (Vance *et al.*, 2015). Por ejemplo, en octubre de 2012, la Comisión Europea autoriza la venta del primer tratamiento de terapia génica con AAVs, Glyberia. Éste compensa la deficiencia en lipoproteína lipasa, cuyo principal síntoma es una pancreatitis severa. Hasta el momento es el

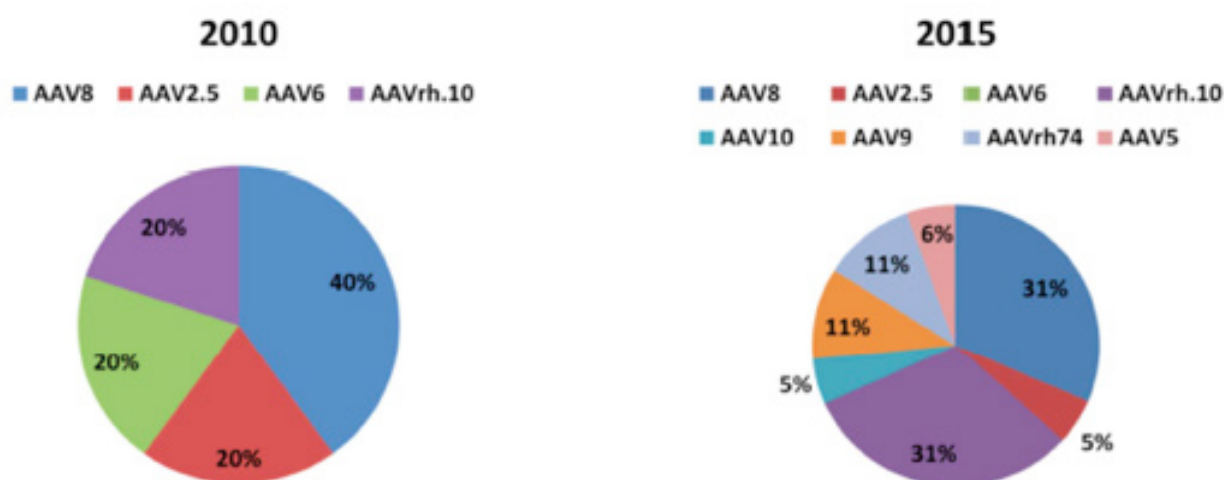


Figura 18. Las gráficas muestran los ensayos clínicos realizados mediante terapia génica con AAVs en 2010 y en 2015 clasificados según el serotipo ensayado. Figura adaptada de Vance *et al.*, 2015.

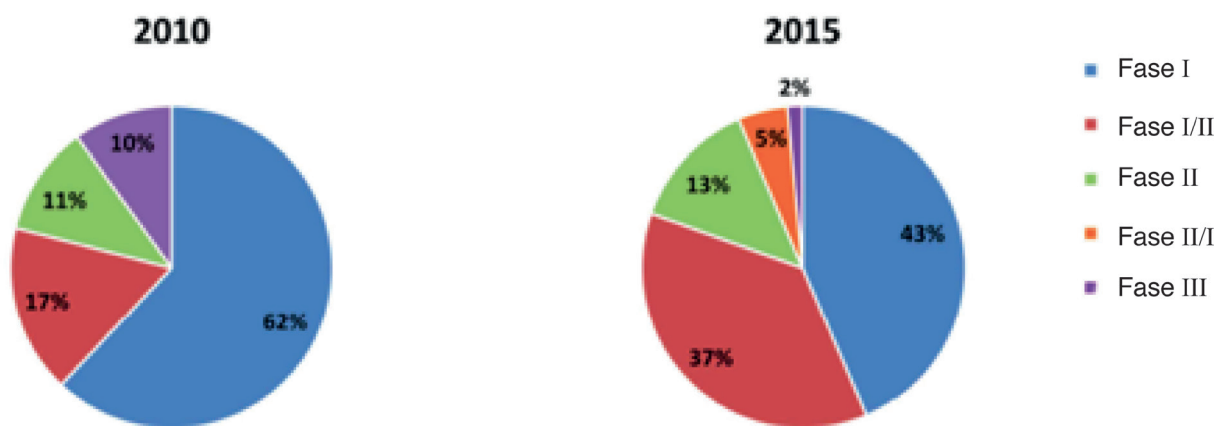


Figura 19. Las gráficas muestran los ensayos clínicos realizados mediante terapia génica con AAVs en 2010 y en 2015 clasificados según la fase clínica en la que se encontraban en el momento del análisis. Figura adaptada de Vance *et al.*, 2015.

tratamiento más caro jamás administrado, con un coste de 1.1 millones de euros por paciente. Los numerosos ensayos clínicos que se han llevado a cabo con AAVs confirman que la liberación del vector es segura, que el sistema inmune humano los tolera y que transfieren eficientemente el gen terapéutico (Vance *et al.*, 2015).

La **Figura 20** resume el espectro de las enfermedades en las que se ha probado la terapia génica con AAVs a fecha de 2015. Las estadísticas muestran que las enfermedades neurológicas y oculares están ganando mayor interés ya que son tejidos inmunológicamente privilegiados (Vance

et al., 2015).

6.4.1. Terapia génica con virus adenoasociados en enfermedades metabólicas

Las enfermedades congénitas relacionadas con el metabolismo afectan, aproximadamente, a uno de cada 500 nacimientos. En la mayoría de los casos, la causa es la deficiencia funcional en una determinada enzima, subunidad enzimática o proteína transportadora asociada a una ruta metabólica (Alexander *et al.*, 2008). Además, teniendo en cuenta que una enorme cantidad de proteínas se sintetizan y metabolizan en el hígado, la capacidad de conseguir una expresión estable y eficiente en los hepatocitos de un vector terapéutico resulta de enorme interés (Sands, 2011). Por tanto, los AAVs se presentan como una terapia prometedora para el tratamiento de enfermedades metabólicas y, más concretamente, las enfermedades metabólicas hepáticas.

Hasta la fecha, se han ensayado diferentes abordajes con vectores de AAVs para más de 30 enfermedades metabólicas en diferentes animales, resumidas en la **Tabla 4**. En un número significativo de casos, los

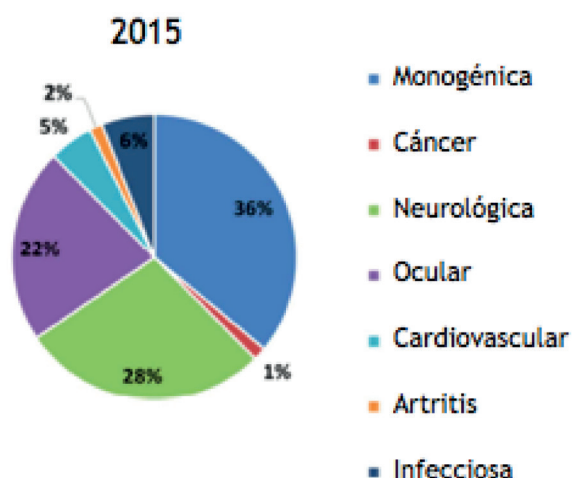


Figura 20. Las gráficas muestran los ensayos clínicos realizados mediante terapia génica con AAVs en 2010 y en 2015 clasificados según enfermedad tratada. Figura adaptada de Vance *et al.*, 2015.

Trastornos por acumulación de lisosomas	Enfermedad de Pompe Mucopolisacaridosis tipo VII Galactosialidosis
Trastornos del metabolismo de las proteínas y aminoácidos	Deficiencia en ornitina transcarbamilasa Fenilcetonuria Homocistinuria Aciduria Enfermedad de Canavanmetilmalónica
Trastornos del metabolismo energético	Defecto en el complejo piruvato deshidrogenasa Neuropatía óptica hereditaria de Leber Deficiencia en adenosina desaminasa
Trastornos del metabolismo de las lipoproteínas	Hipercolesterolemia familiar Deficiencia en proteína lipasa
Trastornos del metabolismo de carbohidratos	Enfermedad de Von Gierke
Otros trastornos metabólicos	Deficiencia en α 1-antitripsina

Tabla 4. Enfermedades en las que se ha ensayado un abordaje terapéutico con AAVs.
Figura adaptada de Vance *et al.*, 2015..

resultados han sido positivos ya que el fenotipo que presentase la enfermedad se ha corregido total o parcialmente (Alexander *et al.*, 2008). Muchas de ellas aparecen también en la [Figura 17](#), la cual resume las enfermedades que están siendo tratadas actualmente mediante terapia génica con AAV según el serotipo (Vance *et al.*, 2015).

El conocimiento de los factores y las vías de señalización necesarias para mantener los niveles de glucosa en el rango adecuado resultan esenciales para entender las bases fisiopatológicas de la diabetes y planear estrategias terapéuticas para prevenir y/o limitar estas complicaciones (Neubauer y Kulkarni, 2006).

Así, la asociación del GLUT2 con IRA se postula como un posible mecanismo *in vivo* para el mantenimiento de la glucosa que daría lugar a una posible estrategia terapéutica para prevenir la diabetes

tipo 2 en su fase de prediabetes. El uso de AAVs podría conducir a un camino eficaz para conseguir este objetivo, concretamente como vectores que transporten las isoformas del IR al hígado. Pese a no existir un modelo animal que reproduzca tal cual cómo se produce la diabetes tipo 2 en humanos, el modelo iLIRKO se presenta como el candidato ideal, ya que desarrolla hiperglucemia y resistencia a insulina mantenidas en el tiempo, ambas características fundamentales de la diabetes tipo 2 en humanos. Además, puesto que la cascada de señalización de la insulina presenta numerosos entresijos moleculares, desgranar esa red a nivel de sus receptores, tanto *in vitro* como *in vivo*, resulta fundamental para profundizar en el entendimiento del papel exacto que desempeñan las proteínas que componen esa cascada y sus puntos de *crosstalk* (interacción).

05/

objetivos

La diabetes tipo 2 es una enfermedad de carácter poligénico cuya etiología en humanos a día de hoy no se conoce específicamente. Para profundizar en el estudio de esta enfermedad se han generado numerosos modelos animales *knockout*, centrados principalmente en la vía de señalización de la insulina e IGF-I. Sólo la delección constitutiva específica del IR en hígado (LIRKO) muestra una marcada resistencia a insulina e intolerancia a glucosa, destacando así el papel metabólico fundamental de este órgano. Sin embargo, el fenotipo diabético de estos ratones se pierde con la edad, ya que los animales desarrollan daño hepático a partir de los dos meses de vida que se acentúa con la edad (Michael *et al.*, 2000). Este efecto se debe a la pérdida del receptor de insulina durante el desarrollo embrionario y, aunque la vía de señalización con IGF-I es común en diversos puntos, en este caso, el receptor de IGF-I no es capaz de compensar la carencia. Por tanto, los objetivos

relativos a esta primera parte de la tesis son:

1. Generación del modelo inducible *knockout* específico del IR en hígado (iLIRKO) mediante el cruce de ratones transgénicos que expresan la recombinasa Cre-ER^{T2} bajo el control del promotor de albúmina, específico de hepatocitos, (Alb-Cre-ER^{T2}) con ratones *Ins^{rloxP/loxP}*.
2. Generación del modelo iLIRIGFIRKO (DKO) mediante el cruce de ratones transgénicos que expresan la recombinasa Alb-Cre-ER^{T2} con ratones *Ins^{rloxP/loxP}* e *igf1^{rloxP/loxP}*.
3. Puesta a punto de las condiciones de inducibilidad para el funcionamiento de la recombinasa en los modelos iLIRKO y DKO con el fin de generar la resistencia a insulina hepática deseada sin producir daño hepático en los ratones iLIRKO.
4. Caracterización del fenotipo diabético del modelo iLIRKO.

Diversas cuestiones referentes al papel fisiológico de las isoformas del receptor de insulina permanecen inconclusas. Por tanto, el modo mediante el cual se activan de forma diferencial las distintas cascadas de señalización en respuesta a insulina debe estudiarse más a fondo. Resultados previos *in vitro* de nuestro grupo describen una regulación diferencial de las isoformas en la captación de glucosa a través de su asociación con el GLUT2 en hepatocitos neonatales (Nevado *et al.*, 2006). Por tanto, la expresión hepática diferencial de las isoformas *in vivo* resulta fundamental para conocer el efecto fisiológico global de éstas. Este estudio se realizó mediante un abordaje de terapia génica con virus adenoasociados que contenían la isoforma A o B del receptor de insulina. Así, los objetivos referentes a este apartado engloban tanto la generación de las partículas virales y sus correspondientes estudios relativos a su especificidad y no patogenicidad hepática; así como los efectos de la expresión hepática diferencial de las isoformas en cuanto a la tolerancia a glucosa y regulación de la masa de célula β .

5. Generación de las partículas de virus adenoasociados que contienen las isoformas del receptor de insulina así como la determinación de la dosis idónea a administrar.

6. Estudio del efecto de la expresión diferencial de las isoformas del receptor de insulina en el hígado de los ratones iLIRKO referente al metabolismo glucídico y en los mecanismos compensatorios a nivel pancreático.

El hígado juega un papel central en el mantenimiento de la homeostasia glucídica por medio de la captación y producción de glucosa. Durante la etapa postprandial, parte de la glucosa captada pasa a formar parte del glucógeno. Si se producen defectos en los mecanismos por los

cuales la glucosa y la insulina regulan el metabolismo hepático del glucógeno, la homeostasia glucídica se rompe, lo cual se asocia con enfermedades metabólicas como la diabetes tipo 2. Puesto que las isoformas del receptor de insulina podrían regular la homeostasia glucídica y la glucosa modifica el metabolismo celular mediante regulación alostérica y transcripcional (von Wilamowitz-Moellendorff *et al.*, 2013), centramos nuestro estudio en la vía de la síntesis de glucógeno. Así, los objetivos fundamentales que conciernen a este apartado fueron:

7. Determinación del glucógeno hepático y estudio de las vías de señalización del metabolismo del glucógeno en ratones en función de la isoforma del receptor de insulina expresada, tanto en ratones como en hepatocitos neonatales, así como los mecanismos moleculares implicados.

Aunque todas las formas de la diabetes se caracterizan por una hiperglucemia incontrolada, otros parámetros hormonales se encuentran frecuentemente desregulados en esta enfermedad (Neubauer y Kulkarni, 2006). La interacción entre la glucosa y el metabolismo lipídico no está caracterizada totalmente. Además, el papel que juegan el IR y el IGF-IR en la dislipidemia asociada a la diabetes tipo 2 está poco explorado. Por tanto, el objetivo de este último apartado se centró en el estudio de los principales puntos clave que se desregulan en el metabolismo lipídico en los ratones iLIRKO y DKO.

8. Estudio de los niveles de colesterol y triglicéridos circulantes y hepáticos en los ratones iLIRKO y DKO, así como el perfil lipoproteico correspondiente.

9. Estudio preliminar de los principales genes implicados en la lipogénesis *de novo* y en el transporte reverso del colesterol en los ratones iLIRKO y DKO.

06/

**materiales y
métodos**

1. TRABAJO CON MODELOS ANIMALES

Para el desarrollo del trabajo *in vivo* de esta tesis se generaron dos modelos animales. Por un lado, un modelo inducible para la delección del receptor de insulina específicamente en hepatocitos, iLIRKO (*inducible Liver Insulin Receptor KnockOut*), y para ahondar en los estudios del papel del receptor de insulina en el metabolismo hepático, se generó el ratón doble *knockout* para el IR e IGF-IR, iLIRIGFIRKO (*inducible Liver Insulin Receptor and Insulin-like Growth Factor I Receptor KnockOut*), también inducible y específico para hepatocitos. A este último, para simplificar, nos referiremos como DKO. Para ello se recurrió al sistema Cre-loxP, derivado del bacteriófago P1 (Sauer y Henderson, 1988), que permite la circularización y escisión del genoma de la secuencia flanqueada por secuencias *loxP*, de manera

tejido-específica al expresar la recombinasa Cre bajo promotores específicos (Gu *et al.*, 1994). Los ratones *Insr^{loxP/loxP}* se crearon por recombinación homóloga para introducir secuencias *loxP* flanqueando el exón 4 del *Insr* convirtiéndolo en diana de la recombinasa (Brüning *et al.*, 1998). Para que la delección fuese hepato-específica, se utilizaron ratones transgénicos cuya recombinasa Cre-ER^{T2} está situada bajo el control del promotor de la albúmina (*Alb*), específico de hepatocitos (Schuler *et al.*, 2004). Concretamente, la actividad inducible por tamoxifeno de la recombinasa Cre-ER^{T2} se obtiene como resultado de la fusión de la Cre recombinasa y el dominio de unión triplemente mutado del receptor de estrógenos humano (ER α) (Metzger *et al.* 2011). Las crías *Alb-Cre^{+/-} Insr^{loxP/loxP}* o *Alb-Cre^{+/-} Insr^{loxP/loxP} igf1^{loxP/loxP}* se usaron como control. Para los estudios sólo se han utilizado ratones macho.

Los animales fueron mantenidos en microaisladores de tipo II L (con 4 animales como máximo en cada uno), en racks ventilados individualmente con ciclos de luz/oscuridad de 12 h, alimentación y bebida *ad libitum* desde el destete (realizado a los 21 días). El estado microbiológico de los animales fue controlado sanitariamente siguiendo los criterios de FELASA (*Federation of European Laboratory Animal Science Associations*) y no se reveló la presencia de patógenos. El estado de salud de los animales se controló rutinariamente mediante análisis en animales centinelas. Todo el trabajo descrito en la presente tesis doctoral se realizó según las normas del Comité de Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid.

1.1. CRÍA Y GENOTIPAJE DE ANIMALES

1.1.1. Mantenimiento del modelo iLIRKO

El alelo *Alb-Cre* se mantuvo en heterocigosis (*Alb-Cre*^{+/-}) en hembras (*Alb-Cre*^{+/-}, *Insr*^{loxP/loxP}). Los alelos de *Insr* con el exón 4 flanqueado con secuencias *loxP* fue mantenido siempre en homocigosis (*Insr*^{loxP/loxP}). Para la obtención del modelo iLIRKO se cruzaron machos (*Alb-Cre*^{-/-}, *Insr*^{loxP/loxP}) con hembras (*Alb-Cre*^{+/-}, *Insr*^{loxP/loxP}), obteniéndose un 50 % de animales Control (*Alb-Cre*^{-/-}, *Insr*^{loxP/loxP}) y un 50 % de animales iLIRKO (*Alb-Cre*^{+/-}, *Insr*^{loxP/loxP}) según las leyes mendelianas. Para la obtención del modelo DKO fueron cruzados machos (*Alb-Cre*^{-/-}, *Insr*^{loxP/loxP}, *igf1*^{loxP/loxP}) con hembras (*Alb-Cre*^{+/-}, *Insr*^{loxP/loxP}, *igf1*^{loxP/loxP}), obteniéndose un 50 % de animales control (*Alb-Cre*^{-/-}, *Insr*^{loxP/loxP}, *igf1*^{loxP/loxP}) y un 50 % de animales DKO (*Alb-Cre*^{+/-}, *Insr*^{loxP/loxP}, *igf1*^{loxP/loxP}).

1.1.2. Obtención de ADN de cola de ratón

Un pequeño fragmento de la cola de ratones de entre 3 y 4 semanas de edad se incubó en 300 µL de un tampón compuesto por [Tris-HCl 10 mM, EDTA 100 mM, SDS 0.5 % (p/v), pH 7.4] y proteinasa K a 20 mg/mL (Life Technologies, Carlsbad, EE.UU.) durante toda la noche a 55 °C. Al día siguiente, se extrajo el ADN con 300 µL de una mezcla de fenol, cloroformo e isoamilalcohol (25:24:1) y, tras agitación intensa seguida de centrifugación (4 °C, 10 min, 15000 x g), se recogió la fracción superior. El ADN se precipitó por adición de 500 µL de etanol absoluto y se centrifugó en dos pasos (5 min, 15000 x g, 4 °C). El precipitado se dejó secar durante 5 min. A continuación, se resuspendió en 300 µL de ddH₂O calentada a 65 °C.

1.1.3. Genotipaje

El genotipaje de los animales se realizó por PCR (ver sección 4.2) con 1 µL de la solución anterior (ver sección 1.2.2). Los *primers* y condiciones de PCR quedan recogidos en la [Tabla 5](#).

1.2 GENERACIÓN DEL MODELO INDUCIBLE

1.2.1 Pruebas administración del tamoxifeno: vía enteral o vía parental.

Uno de los usos del tamoxifeno en el laboratorio es el de activar enzimas que posean dominios de unión a estrógenos, por ejemplo Cre-ER^{T2}. El tamoxifeno es un análogo de los estrógenos que se une con mayor afinidad que éstos a los dominios de unión a estrógenos alterados (Tannour-Louet *et al.*, 2002). Existen numerosas vías para la

Gen	Secuencia	Producto	Condiciones (Tm y ciclos)
<i>Alb-Cre</i>	S: 5'-ATTGCTGCATTACCGGTC-3'	Cre-ERT ² 444 bp	57°C, 34 ciclos
	AS: 5'-ATCAACGTTTTGTTTTCGGA-3'		
<i>Igf1rloxP</i>	S: 5'-ATGAATGCTGGTGAGGGTGTCTT-3'	loxP/loxP 310 bp	60°C, 34 ciclos
	AS: 5'-ATCTTGAGTGGTGGGTCTGTTTC-3'	WT 250 bp	
<i>InsrloxP</i>	S: 5'-CTGAATAGCTGAGACCACAG-3'	loxP/loxP 300bp	57°C, 34 ciclos
	AS: 5'-GATGTGCACCCCATGTCTG-3'	WT 270 bp	

Tabla 5. *Primers* utilizados para el genotipaje de los animales.

Método de administración	Pros-contras
Inyección intraperitoneal	Administración de una dosis controlada Menor tiempo de inducción
	Alto estrés para el animal Infecciones en la cavidad peritoneal
Cánula intragástrica	Dosis semicontrolada Alto estrés para el animal Necesaria alta experiencia
Dieta	Sin estrés para el animal
	La dosis depende de la ingesta Dieta poco apetitosa Mayor tiempo de inducción

Tabla 6. Ventajas e inconvenientes de diferentes métodos para la administración de tamoxifeno a ratones.

administración de este compuesto a los ratones, cada una de ellas presenta ventajas e inconvenientes. Los métodos testados se resumen en la [Tabla 6](#).

Ya que en este caso una dosis precisa no es lo primordial y que los resultados obtenidos en cuanto a activación de la recombinasa son similares con dieta que con 4-OHT intraperitoneal (Andersson *et al.*, 2010), la administración de tamoxifeno a

través de la comida parece el protocolo menos agresivo para el animal.

El tamoxifeno se administró a los ratones iLIRKO a partir de las 6 semanas de edad, siempre que hubiesen superado los 20 g de peso, según dos protocolos diferentes:

- 1.- Inyecciones intraperitoneales de la suspensión de tamoxifeno en aceite 100 µL (1 mg/día) durante (3 ó 5 días consecutivos o alternos). El tamoxifeno

(T5648, Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EE.UU.) base se disolvió en aceite de girasol (Sigma-Aldrich) y fue preparado mediante sonicación según lo descrito por (Kühbandner *et al.*, 2000).

2.- Cánula intragástrica: tamoxifeno a 100 mg/mL en solución hidroalcohólica al 10 %. El tamoxifeno se disolvió en etanol absoluto hasta alcanzar una concentración de 1 mg/ μ L y se completó con solución salina filtrada (NaCl al 0,9 % en dH₂O) hasta alcanzar la concentración final deseada. Para disolver bien el tamoxifeno, se utilizó el *vortex* durante el proceso de dilución y, posteriormente, se sonicó a baja intensidad durante 5 ciclos de 30 s con descanso de 30 s. La administración de tamoxifeno fue de 2 dosis de 20 mg seguida de 1 dosis de 10 mg, siempre en días alternos (Whitfield *et al.*, 2015).

1.2.2. Esquema de dietas o esquema definitivo para la generación del modelo inducible

Tras el destete a las tres semanas, los animales fueron alimentados durante dos semanas con dieta libre en soja (RMS-0909-US-EN-02-DS-2016, Harlan Teklad, Indianápolis, IN, EE.UU.) *ad libitum* para evitar la competencia entre los estrógenos propios del animal y el tamoxifeno por la unión al receptor de estrógenos acoplado a la recombinasa. Tras la dieta libre en soja, los ratones fueron alimentados durante 2 semanas con dieta de tamoxifeno (TD.09327, Harlan Teklad) *ad libitum* para inducir la translocación de la recombinasa Cre al núcleo. Después de la dieta de tamoxifeno, los animales fueron alimentados con dieta estándar *ad libitum*. Tanto los animales Control como los animales iLIRKO y los DKO fueron alimen-

tados según las condiciones descritas anteriormente.

1.3. TESTS METABÓLICOS *in vivo*

1.3.1. Test de tolerancia a glucosa

Los animales se ayunaron toda la noche, durante 16 h aproximadamente. Se midió la glucemia en ayunas, punto 0, y se les administró, por inyección intraperitoneal, una dosis de glucosa de 2 g/kg de peso. La glucosa en sangre de la vena de la cola se midió a los 30, 60 y 120 min después de la inyección con glucómetro y tiras reactivas para la medición de la glucemia de Accu-Check (Roche, Penzberg, Alemania).

1.3.2. Test de tolerancia a insulina

Se realizó en animales sin ayunar a las 11 am. Se midió la glucemia en ayunas, punto 0, y se les administró, por inyección intraperitoneal, una dosis de insulina (Humulin regular, Eli Lilly, Indianápolis, IN, EE.UU.) de 1 U/kg de peso. La glucosa en sangre de la vena de la cola se midió a los 15, 30 y 60 min después de la inyección con glucómetro y tiras reactivas para la medición de la glucemia de Accu-Check (Roche, Penzberg, Alemania). Los resultados de los test de tolerancia a insulina (ITT) se representaron como porcentaje respecto a la concentración de glucosa inicial en sangre.

1.4. OBTENCIÓN DE PLASMA SANGUÍNEO

Para la obtención del plasma, la sangre se extrajo bien con una jeringuilla ligera-

mente bañada en enoxaparina sódica 60 mg (6000 UI), bien de la cola del ratón a un tubo eppendorf también ligeramente bañado enoxaparina sódica. La sangre se dejó sedimentar por gravedad en hielo durante 30 min y, posteriormente, se centrifugó a 1500 rpm (con deceleración sin freno) durante 10 min y a 4 °C.

1.5. SACRIFICIO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

En todos los casos que se describen en la presente tesis, los animales fueron sacrificados tras 24 h de ayuno seguidas de 1 h de realimentación. Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y desinfectados con etanol 70 % (v/v). El abdomen se abrió mediante incisión en forma de "V" desde el abdomen inferior extendiéndose hacia las porciones laterales del diafragma, con objeto de exponer todos los órganos de la cavidad peritoneal. Los órganos recogidos se utilizaron bien para congelar directamente, bien para incluir en parafina. En los casos en los que se quería recoger un gran volumen de sangre, los animales se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal de 2,2,2-tribromoetanol en 2-metil-2-butanol y dH₂O 1:40 (Sigma-Aldrich). Una vez alcanzada la ausencia del reflejo podal, la sangre se extrajo de la vena yugular.

2. CULTIVOS CELULARES

2.1. LÍNEAS CELULARES Y MEDIOS DE CULTIVO

Las líneas de hepatocitos neonatales fueron establecidas según el método previamente descrito por Nevado *et al.*, 2006.

Todos los medios de cultivo y suplementos fueron obtenidos de Life Technologies, salvo excepciones indicadas. Los medios fueron suplementados con antibióticos: penicilina G (12 µg/mL), estreptomycin (10 µg/mL), anfotericina B (0.25 µg/mL) y MycoZap® (Lonza, Basilea, Suiza).

Tanto los hepatocitos neonatales como las células HEK293T, utilizadas para la producción de partículas virales, fueron cultivados en DMEM glucosa 4.5 g/L suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10 % y HEPES 20 mM, pH 7.4.

2.2. CONDICIONES DE CULTIVO, MANTENIMIENTO Y EXPERIMENTACIÓN

2.2.1. Condiciones de cultivo

Las células se cultivaron en placas de poliestireno tratado para cultivo (Becton Dickinson, Franklin Lakes, EE.UU.) y mantuvieron en incubador a 37 °C en una atmósfera controlada con alta humedad y CO₂ al 5 %. Las células se subcultivaron tras lavado con PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 4.3 mM, KH₂PO₄ 1.47 mM, pH 7.4) e incubación con una solución de tripsina 0.25 % y EDTA 0.02 % en PBS. La tripsina permite levantar las células adherentes de la placa al digerir proteínas que mantienen a las células unidas entre sí y a la placa. La digestión se paró mediante adición de medio completo con suero. El subcultivo se realizó dos veces por semana.

2.2.2. Congelación, criopreservación y descongelación de líneas celulares

Para congelar una línea celular, las células se tripsinizaron y, una vez parada la reac-

ción, se centrifugaron (3 min, 110 × g) para ser resuspendidas en FBS suplementado con dimetilsulfóxido 10 % (v/v) e introducidas en criotubos debidamente etiquetados (Thermo Fisher, Waltham, EE.UU.). El proceso de congelación fue llevado a cabo enfriando desde T^a ambiente hasta -80 °C a un ritmo de -1 °C/min. Para ello, los criotubos se colocaron sobre un soporte de polietileno bañado por isopropanol (Mr. Frosty, Thermo Fisher) que fue introducido en un congelador a -80 °C. Las células así congeladas pudieron mantenerse a -80 °C durante meses. Para periodos más largos, los criotubos se trasladaron a un tanque de nitrógeno líquido (-190 °C).

La descongelación fue realizada de forma rápida, pasando los viales directamente de -80 °C o nitrógeno líquido a un baño a 37 °C, con agitación manual. Una vez descongeladas, las células fueron sembradas en placas de cultivo con medio completo suplementado con FBS al 10 %.

2.2.3. Condiciones de experimentación

Las células se sembraron el día anterior al comienzo del experimento. Las deprivaciones de suero y glucosa previas a los estímulos se realizaron durante 5 h en medio sin suero y con diferentes concentraciones de glucosa, según el experimento.

2.2.3.1. Micoplasma

Los efectos de la contaminación por micoplasmas en las líneas celulares sigue siendo uno de los mayores problemas encontrados en investigación con cultivos celulares. Esta contaminación puede producir grandes cambios en los cultivos que infecta (Russell *et al.*, 1975). Por ello,

todas las líneas fueron ensayadas para presencia de micoplasma tras su descongelación y, de forma rutinaria, 1 ó 2 veces al mes. Para ello, el sobrenadante de células cultivadas durante al menos 48 h se recogió y analizó por PCR para comprobar la presencia de una secuencia específica de *Mycoplasma sp.* (S: 5'-GGCGAATGG-GTGAGTAACACG-3'; AS: 5'-CGGATAAC-GCTTGCGACCTATG-3')

3. TÉCNICAS DE ADN RECOMBINANTE

3.1. CULTIVO DE BACTERIAS

3.1.1. Cultivo en placa de agar-LB

Las bacterias se cultivaron en placas Petri con agar bacteriológico 1.5 % (p/v) en medio LB, *Lysogeny (Luria-Bertani) broth*: NaCl (10 g/L), triptona (10 g/L), extracto de levadura (5 g/L) (Bertani, 1951). El medio se autoclavó y enfrió hasta 55 °C para la adición de ampicilina (100 µg/mL). Cada placa Petri porta 20-25 mL de medio LB sobre la cual, una vez solidificado, se sembraron las bacterias por estrías utilizando un asa de Kolle. Se dejaron crecer no más de 15 h, con el fin de evitar la aparición de colonias satélite en las placas de agar con ampicilina. Se trabajó en condiciones asépticas, en la proximidad de un mechero Bunsen, con el que además se esterilizó el asa de Kolle.

3.1.2. Cultivo en LB líquido

Todas las inoculaciones para la amplificación de plásmidos provinieron de colonias únicas seleccionadas de placas de agar

con antibiótico. Se inocularon primeramente en un volumen de 3,5 mL de LB con antibiótico (*miniprep*) y se crecieron en un incubador a 37 °C en tubos de polipropileno no cerrados herméticamente para permitir el intercambio de gases, con agitación vigorosa (250 rpm) hasta la saturación del cultivo (10-15 h). En los casos de interés, la *miniprep* se pasó directamente a un volumen de 100-200 mL de LB con antibiótico (*maxiprep*), y se cultivó en agitación durante 15 h.

3.1.3. Congelación (*glycerol-stock*)

El mantenimiento de las bacterias *E. coli* que expresaban las construcciones de interés en medio LB (*glycerol-stock*), se realizó a -80 °C en criotubos que contienen una mezcla de 500 µL de medio LB con 500 µL de una solución estéril de glicerol 50 % (v/v). Para recuperar las construcciones, se raspó la superficie del *glycerol-stock* con un asa de Kolle, sin llegar a descongelarlo para ello, y se sembró en placas de agar.

3.2. PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS Y TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS

Los plásmidos recombinantes que portan los virus adenoasociados recombinantes generados (AAV-AAT-IRA y AAV-AAT-IRB) contienen el transgén del receptor de insulina humano, bien la isoforma A o isoforma B (Número de acceso de GeneBank NM_001079817.2 y NM_000208.3 respectivamente) bajo el control transcripcional del promotor humano α 1-antitripsina (Vanrell *et al.*, 2011; Zolotukhin *et al.*,

1999). En el inserto se incluye una cola de 19 adeninas [poly(A)]. Para generarlos, los plásmidos pUC57-IRA-sPolyA y pUC57-IRB-sPolyA, cedidos por el Dr. Ronald Kahn (Joslin Diabetes Center, Boston, EE.UU), se subclonaron dentro del p-AAV-MCS. El *cassette* fue flanqueado por dos repeticiones terminales invertidas (ITR) pertenecientes a la forma *wildtype* del AAV de serotipo 2 (AAV2). Como control, *INSR* se reemplazó por el gen reportero luciferasa, proveniente del plásmido pdLucFXR cedido por el Dr. Tomás Aragón (Centro de Investigación Médica Aplicada, Pamplona, España) (número de acceso a GenBank AY603759) o proteína verde fluorescente para generar AAV-AAT-luc y AAV-AAT-GFP, respectivamente.

3.2.1. Purificación de plásmidos

Una vez que el crecimiento de las bacterias fue el adecuado, se procedió a la extracción del ADN con el Qiagen Maxi plasmid kit (Qiagen, Hilden, Alemania). Para ello, el contenido del matraz se pasó a tubos de centrifuga de 200 mL de capacidad que previamente habían sido lavados con etanol 70 % y tratados con luz ultravioleta. Las bacterias se centrifugaron a 3.000 rpm (centrífuga refrigerada Sorvall modelo RC-5, Sorvall, Dupont Inst., Alemania), durante 15 min, a 4 °C. A partir de este momento se inició la fase de extracción del ADN plasmídico propiamente dicha, de acuerdo al método de la lisis alcalina descrita por (Sambrook *et al.*, 1989) según las instrucciones del fabricante (Qiagen). El precipitado de bacterias se resuspendió en 10 mL de la solución de resuspensión que contenía 50 mM Tris-Cl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/mL ribonucleasa A. A continuación, se añadieron 10 mL de la solución de lisis (200 mM NaOH, SDS 1 %), se mezcló bien por inversión de los tubos

y se dejaron en reposo durante 5 minutos a temperatura ambiente para que se produjera la lisis alcalina de las bacterias. Seguidamente, se añadieron 10 mL de la solución de neutralización (3 M KOAc, pH 5.5), se mezcló rápidamente para evitar la precipitación del SDS e incubó en hielo 20 min. Posteriormente se centrifugó a 9000 rpm, durante 30 min a 4 °C. El sobrenadante, que contenía el ADN plasmídico, se pasó a través de una columna de intercambio aniónico, columna que contenía una resina de intercambio aniónico previamente equilibrada con tampón 750 mM NaCl, 50 mM MOPS, pH 7.0, 15 % isopropanol, 0.15 % Triton X-100. La resina de la columna (de carga positiva) retiene los ácidos nucleicos (de carga negativa). A continuación, la columna se lavó dos veces con un tampón que mantenía el pH (1.0 M NaCl, 50 mM MOPS, pH 7.0, 15 % isopropanol). Posteriormente se añadió un tampón de pH superior (1.25 M NaCl, 50 mM Tris-Cl, pH 8.5, 15 % isopropanol), el cual modifica la carga neta de la resina y permite la salida de los ácidos nucleicos. Para precipitar el ADN, al eluido se le añadieron 0.7 volúmenes de isopropanol que se mezclaron por inversión y se dejaron precipitar a -20 °C (durante varias horas). A continuación, los tubos se centrifugaron a 15000 x g, durante 1 h, a 4 °C. El sobrenadante se lavó con 2 mL de etanol al 75 % y se centrifugó de nuevo a 15000 x g, durante 10 min. El precipitado se dejó secar hasta que se hubo evaporado todo el etanol. Una vez seco, el precipitado se resuspendió en 400-600 µL de ddH₂O calentada a 65 °C y se procedió a su valoración espectrofotométrica. El ADN plasmídico así obtenido se conservó a -20 °C.

3.2.2. Transformación de bacterias

Los vectores se transformaron en bacterias *E. coli* cepa XL10-Gold® ultracompetentes (Stratagene, San Diego, CA, EE.UU.)

o One Shot® TOP10 electrocompetentes (Thermo Fisher). 100 µL de bacterias *E. coli* cepa XL10-Gold® ultracompetentes (Stratagene) enriquecidas con 2-mercaptoetanol 25 mM fueron transformadas con 3 µL de ADN (50-100 ng), mediante un pulso de calor a 42 °C, siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, se enfriaron en hielo durante 5 min. Para aumentar la eficiencia de transformación, se añadieron 250 µL de medio SOC (Sigma-Aldrich) (Hanahan, 1983) y se mantuvieron a 37 °C, durante 1 h en agitación. Las células se sembraron con un asa de Drigalski en una placa de LB-agar con antibiótico.

En el caso de *E. coli* One Shot® TOP10 electrocompetentes (Thermo Fisher), 100 µL de bacterias fueron transformadas con 3 µL de ADN (50-100 ng). Previamente, el ADN plasmídico fue purificado con acetato sódico y etanol y resuspendido en ddH₂O para eliminar restos de sales. La mezcla se introdujo en una cubeta de electroporación previamente enfriada en hielo. La electroporación se realizó a 1.8 kV - 25 µF y se añadieron 250 µL de medio SOC. La mezcla se transfirió a un tubo eppendorf y se mantuvo a 37 °C durante 1 h en agitación. Al igual que en el caso anterior, las células se sembraron con un asa de Drigalski en una placa de LB-agar con antibiótico.

3.3. CLONAJE Y TRABAJO CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

3.3.1 Digestión con enzimas

Las enzimas de restricción fueron usadas de manera rutinaria para comprobar la correcta identidad de plásmidos amplificados y para la generación de los vectores virales. Las enzimas de restricción utilizadas fueron AfeI, AflII, BamHI, BstXI,

EcoRI, HinCII, PmlI, PspOMI, XmaI (New England Biolabs, Ipswich, EE.UU.).

3.3.2. Precipitación del ADN plasmídico con acetato sódico y etanol

En los casos en los que no fue posible la utilización de enzimas de digestión con tampones compatibles y el cambio de tampón era absolutamente necesario o previo paso a la transformación en bacterias electrocompetentes, el DNA plasmídico fue precipitado con una mezcla de acetato sódico 3 M pH 5.2 (0.1 volúmenes) y etanol absoluto (2.5 volúmenes). La mezcla se congeló a -80 °C durante 1 h y se centrifugó a 14000 rpm durante 30 min. Posteriormente se lavó con etanol al 75 %, el precipitado se dejó secar y, finalmente, se resuspendió en ddH₂O para su posterior cuantificación.

3.3.3. Generación de extremos romos

En algunos casos hubo que generar extremos romos a partir de extremos cohesivos para que la ligación de plásmido e inserto fuese posible. En estos casos se recurrió al fragmento Klenow de la ADN polimerasa I (New England Biolabs), la cual mantiene la actividad polimerasa 5'→3' y la exonucleasa 3'→5'. Para ello se añade la enzima a la disolución y dNTP a 33 μM cada uno. Se calienta a 25 °C durante 15 min. La reacción se para en hielo. Para inactivar la enzima completamente, se calienta a 75 °C durante 20 min.

3.3.4. Defosforilación de los extremos del vector

La fosfatasa alcalina intestinal de ternera, *Calf Intestinal alkaline Phosphatase*, (CIP) (New England Biolabs) cataliza la desfos-

forilación de forma no específica de los extremos 5' y 3' del ADN del vector de clonación. La eliminación de extremos fosforilados, impide la recircularización del ADN del plásmido linealizado durante la ligación. La enzima debe incubarse durante 30 min a 37 °C según las instrucciones del fabricante.

3.3.5. Purificación de bandas de geles de agarosa

Las bandas de los geles de agarosa al 1 % con el ADN linearizado fueron cortadas en un transiluminador UV (Vilber Lourmat, TF-35M, Francia) y digeridas usando el QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. El ADN fue eluido en 50 μL de ddH₂O. La cuantificación del inserto se realizó mediante valoración espectrofotométrica. El inserto una vez purificado se guardó a -20 °C.

3.3.6. Ligación y cribado de colonias positivas

Para la ligación se probaron diferentes proporciones de inserto y plásmido linealizado (1:1, 1:4, 1:6). La ligación se realizó con la T4 DNA ligasa (New England Biolabs), siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción de ligación se llevó a cabo durante toda la noche a 16 °C y la posterior transformación en bacterias se realizó con 3 μL de la mezcla final.

Se seleccionaron entre 10 y 20 colonias positivas por construcción, las cuales se amplificaron por *miniprep*. Todas las inoculaciones para la amplificación de plásmidos provinieron de colonias únicas seleccionadas de placas de agar con antibiótico. Como primer paso, se inocularon en un volumen de 3.5 mL de LB con ampicilina 100 μg/μL (*miniprep*) y se cultivaron en un incubador a 37 °C, en tubos de

polipropileno no cerrados herméticamente para permitir el intercambio de gases, con agitación vigorosa (~250 rpm) hasta que se alcanzó la saturación del cultivo (10-15 h). La *miniprep* se realizó con 2 mL del cultivo y según las instrucciones del fabricante del kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen). El ADN se utilizó para comprobar las colonias, es decir, saber si habían incluido o no el vector de interés. El 1.5 mL restante se guardó a 4 °C como preinóculo para la *maxiprep* (*glycerol-stock*). Los plásmidos de interés se amplificaron vertiendo directamente 1.5 mL proveniente de la *miniprep*, a un volumen de 100-200 mL de LB con antibiótico (*maxiprep*), el cual se cultivó en agitación durante 15 h.

3.3.7. Secuenciación

Los plásmidos, obtenidos de diversas fuentes, fueron secuenciados rutinariamente para comprobar su integridad y la presencia de mutaciones puntuales específicas. Los plásmidos pBABE con los insertos AAT-IRA/B fueron secuenciados para comprobar que habían introducido la secuencia de forma correcta. Para su secuenciación se utilizaron 6 µL/reacción (100 ng ADN/µL) y 2 µL/reacción de *primer* a 5 pmol/µL, en un secuenciador ABI Prism 3730 (Life Technologies).

4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

4.1. AISLAMIENTO DE ARN DE LÍNEAS CELULARES Y TEJIDOS

Se siguió el método de Chomczynski y Sacchi el cual consiste en la extracción de ARN con una mezcla de tiocianato de

guanidinio, fenol y cloroformo (Chomczynski y Sacchi, 1987). Las células se lavaron una vez con PBS frío, y en una campana extractora de gases, y sobre hielo, se añadió Trizol (Life Technologies) 170 µL por placa de 60 mm, con el fin de conseguir la lisis celular y solubilizar el ARN. Las muestras se homogeneizaron y se trasladaron a tubos eppendorf, a los que se añadieron 35 µL de cloroformo. Se agitaron las muestras con la ayuda de un agitador mecánico y se dejaron reposar 15 min en hielo para seguidamente centrifugarlos (15 min, 15000 × g, 4 °C). Tras la centrifugación, se obtienen dos fases, la inferior, orgánica, contiene las proteínas y el ADN y la superior, acuosa, contiene el ARN, el cual se trasladó a un nuevo tubo eppendorf. El volumen obtenido con el ARN solubilizado se mezcla con un volumen igual de isopropanol, se agita por inversión y se mantiene a -20 °C durante más de 1 h para la precipitación de los ácidos nucleicos. A continuación, se centrifuga durante 15 min a 15000 × g y a 4 °C. El sobrenadante se elimina por inversión y el precipitado se lava con 1 mL de etanol frío al 70 % (v/v). Se vuelve a centrifugar y el precipitado de ARN se resuspende en 20 µL de ddH₂O-dietilpirocarbonato 0.1 % (v/v).

En el caso de la extracción de RNA de tejidos, los 200 mg de tejido se homogeneizaron en 1 mL de Trizol con Ultra-Turrax T10 basic (IKA, Stanfen, Alemania) a baja velocidad y durante, aproximadamente, 20 s en hielo. A continuación se siguió el mismo protocolo que con las células.

4.2. RT-PCR

4.2.1. Valoración de ácidos nucleicos

El contenido de ácidos nucleicos se valora por una lectura espectrofotométrica doble

a 260 y 280 nm en cubeta de cuarzo. A 260 nm los ácidos nucleicos tienen un máximo de absorción, mientras que a 280 nm presentan un máximo los aminoácidos aromáticos de las proteínas. El ratio A260/A280 da una idea del grado de contaminación de las muestras con proteínas que, en condiciones óptimas, debe situarse entre 1.8 y 2. Para valorar el contenido de los ácidos nucleicos, hay que tener en cuenta que cada unidad de densidad óptica a 260 nm se corresponde con 20 µg/mL de oligonucleótidos, 40 µg/mL para ARN de cadena sencilla y a 50 µg/mL para ADN.

4.2.2. Síntesis de ADNc por retrotranscripción

Para eliminar posibles contaminaciones con ADN, se incubaron 2-3 µg de ARN con 10 U de ADNasa I (Roche) en un tampón de incubación (Tris-HCl 40 mM, NaCl 10 mM, MgCl₂ 6 mM, CaCl₂ 1 mM, pH 7.9) y 20 U de inhibidor de ARNasas, RNasin (Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU.) 30 min a 37 °C. Posteriormente la ADNasa se inactivó por calor, 5 min a 95 °C.

Para la síntesis del ADNc, la solución resultante de la reacción anterior fue sometida a transcripción inversa con ayuda del High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies). Se utilizaron cebadores aleatorios, retrotranscriptasa (50 U/µL) e inhibidor de ARNasa (1 U/µL) según las instrucciones del fabricante. La solución se incubó durante 2 h a 37 °C y, posteriormente, la retrotranscriptasa se inactivó por calor a 95 °C durante 5 min.

4.2.3. PCR y electroforesis en geles de agarosa

La PCR fue realizada a partir de ADN extraído de cola de ratón o bien de ADNc. Se usaron reactivos de Biotools, Madrid, España; salvo excepciones indicadas. Para la reacción se utilizó 1 µL de ADN en un volumen final de 25 µL compuesto de tampón de reacción [Tris-HCl 75 mM, MgCl₂ 2 mM, KCl 50 mM, (NH₄)₂SO₄ 20 mM, pH 9.0], cebadores 0.2 µM (cada uno), dNTPs 0.2 mM (cada uno) y 1 U de ADN polimerasa.

Las PCR se desarrollaron en un termociclador Veriti 96-well (Life Technologies). En la etapa de hibridación, la temperatura utilizada fue la temperatura de *melting* (T_m) teórica de los *primers* (ajustada por la concentración de sales y calculada con Primer-BLAST) restándole 5 °C. Los *primers* utilizados están recogidos en la [Tabla 7](#) en la que se especifica tanto la T_m como el número de ciclos. En los casos en los que fue posible se diseñaron *primers* tales que uno de la pareja hibridase con uniones exón-exón (específicos de ARNm maduros).

El producto de la PCR se completó con un tampón de carga, concentración final [Tris-HCl, 1.7 mM, azul de bromofenol 0.005 % (p/v), xilano cianol 0.005 % (p/v), glicerol 10 % (v/v), EDTA 10 mM, pH 7.6], y fue resuelto mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1-3 % (p/v) en TAE (Tris-HCl 40 mM, ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM, pH 8.0), suplementado con GelRed (Biotium, Hayward, EE.UU.) tras la disolución de la agarosa. La electroforesis se llevó a cabo en tampón TAE. Como marcadores para electroforesis de ADN se utilizaron los siguientes: para PCR, Phi-X174/HaeIII (Promega) y para plásmidos

Gen	Secuencia	Producto	Condiciones (Tm y ciclos)
<i>Insr</i> (exón 4)	S: 5'-CTGTTCCGGAACCTGATGAC-3'	IR 512 pb	58 °C, 35 ciclos
	AS: 5'-ATACCAGAGCATAGGAG-3'	IRKO 363 pb	
<i>Insr</i> (exón 11)	S: 5'-TAGGAAGACGTTTGAGGATT -3'	IRB 316 pb	58 °C, 30 ciclos
	AS: 5'-CACCGTCACATTCCCAACAT-3'	IRA 280 pb	

Tabla 7. *Primers* utilizados para RT-PCR.

Gen	Secuencia
<i>Insr</i> (intrón-exón)	S: 5'-CGTACCCCGATTGAGTGAT-3'
	AS: 5'-TTGAGCAGAAGAGCTGCTACGT-3'
<i>Actb</i>	S: 5'-CGCCACCAGTTCGCCATGGA-3'
	AS: 5'-TACAGCCCGGGGAGCATCGT-3'

Tabla 8. *Primers* utilizados para Q-PCR.

Gen	Secuencia
<i>Serpina1</i>	5'-CCCTGTTTGCTCCTCCGATAA-3'
	5'-CGCATCGAGAAGAACAATGAGC-3'
<i>INSRA/B</i>	5'-CAACATTCGAGGAGGCAACAATC-3'
	5'-CCCACTACCTGGTTTCTGG-3'
	5'-CAATGGTCTGATCGTGCTGT-3'
	5'-CTACCCTTCAAGAGATGATTC-3'

Tabla 9. *Primers* utilizados para la secuenciación de los vectores AAV-AAT-IRA y AAV-AAT-IRB.

o fragmentos grandes 1 Kb Plus Ladder (Life Technologies). El resultado fue visualizado mediante un transiluminador UV, y las imágenes captadas con una cámara CCD (*charged coupled device*), ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, Hercules, EE.UU.).

4.2.4. PCR cuantitativa

El contenido de ADNc obtenido a partir del ARN del hígado fue evaluado en un ABI Prism 7900 (Life Technologies) con *primers* específicos, recogidos en la [Tablas 8 y 9](#), y SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies). La abundancia relativa de los ARNm fue calculada tomando el ARNm de β -actina como control invariante. Las medidas fueron realizadas por triplicado en las siguientes condiciones:

94 °C 5 min] 35 ciclos
30 °C (Tm) 60 s	
72 °C 25 s	
80 °C 10 s	
4 °C final	

5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS

5.1. EXTRACTOS PROTEICOS

5.1.1. Obtención de extractos proteicos

Las células fueron lavadas 2 veces con PBS frío, colocadas sobre hielo y raspadas con 50-500 μ L de tampón de lisis según el formato y densidad celular [Nonidet-P40 1 % (v/v), Tris-HCl 50 mM, EDTA 5 mM, EGTA 5 mM, NaCl 150 mM, NaF 20 mM, pH 7.5] y añadidos extemporáneamente PMSF 1 mM, aprotinina 10 μ g/mL y leupeptina 2 μ g/mL. El lisado se trasladó a tubos eppendorf y tras 5-10 min en hielo y un ligero agitado fueron centrifugados (15 min, 15000 $\times g$, 4 °C). Se recogió el sobrenadante con el lisado proteico, y se descartaron los restos celulares del *pellet*.

Los hígados y riñones usados para *Western blot* e inmunoprecipitaciones se cortaron en trozos de aproximadamente 200 mg y se lavaron 3 veces con PBS frío 1X para eliminar contaminantes externos, principalmente sangre, y se centrifugaron (2 min, $290 \times g$, 4 °C). La homogenización del tejido se llevó a cabo con Ultra-Turrax T10 basic (IKA, Stanfen, Alemania) a baja velocidad y durante, aproximadamente, 20 s en hielo y en el tampón de lisis ya descrito. Los extractos fueron centrifugados (15 min, $15000 \times g$, 4 °C) y el sobrenadante se traspasó a nuevos tubos eppendorf.

5.1.2. Valoración de proteínas

Las proteínas se determinaron por el método de Bradford (Bradford, 1976). Este ensayo se basa en la observación del cambio de absorbancia (de 465 a 595 nm) que se produce cuando se añaden proteínas a una solución ácida de Coomassie Brilliant Blue G-250. Las interacciones hidrofóbicas e iónicas producidas por aminoácidos básicos (principalmente arginina) estabilizan la forma aniónica del reactivo indicador, causando un cambio de color visible. Como control, se prepara una curva de calibrado de 0-10 µg/mL a partir de una solución estándar de BSA de 2 mg/mL (Bio-Rad). Para el ensayo se cuantifica la absorbancia a 595 nm de una mezcla de 2 µL de la muestra a analizar en 1 mL de la solución de Bradford (Bio-Rad) diluida en ddH₂O (1:5).

5.2. WESTERN BLOT

5.2.1. Preparación de muestras para electroforesis

Las muestras se prepararon a igual concentración 1 µg/µL de proteína total, dilu-

yendo en tampón de lisis, en un volumen total determinado el cual incluye también tampón de Laemmli concentrado (Laemmli, 1970) para una concentración final [Tris-HCl 100 mM, glicerol 5 % (v/v), SDS 2 % (p/v), 2-mercaptoetanol 1 % (v/v), azul de bromofenol 0,004 % (p/v), pH 6.8]. Las muestras se desnaturalizaron (5 min, 95 °C). Se cargaron entre 10-50 µg de muestra por pocillo en geles de SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*). En cada gel se cargó también un estándar de marcador del peso molecular Precision Plus Protein Standards All Blue (Bio-Rad).

5.2.2. Electroforesis en geles de SDS-PAGE

El fraccionamiento del componente proteico de los extractos celulares, se realizó por electroforesis en geles discontinuos de SDS-PAGE, según el método descrito por Laemmli (Laemmli, 1970), empleando un equipo de electroforesis Miniprotean II o TetraSystem (Bio-Rad).

Se prepararon geles con dos zonas de diferente concentración de poliacrilamida: 4 % para el gel superior concentrante y entre 6-15 % para el gel inferior separador. El primero, que contiene los pocillos de depósito de muestras, sirve para concentrar y alinear las muestras; el segundo, para separar las proteínas según su peso molecular. La concentración de poliacrilamida final en el gel utilizada varió en función del peso molecular de las proteínas a analizar. Los geles contienen: solución al 30 % que contiene acrilamida y bis-acrilamida en proporción 29:1 (Bio-Rad); SDS, que confiere a las proteínas una carga negativa uniforme, Tris-HCl pH 8.8 en el gel separador y pH 6.8 en el concentrante; persulfato amónico y TEMED (Panreac,

Barcelona, España), que catalizan la polimerización del gel. Las proporciones de los diferentes componentes varían según el tipo de gel.

Para el desarrollo de la electroforesis se utilizó el siguiente tampón: Tris-base 25 mM, glicina 190 mM y SDS 0.1 % (p/v), pH 8.3, con una fuente Powerpac HC de Bio-Rad, a un voltaje constante de 80 V para el gel concentrante y de 110-150 V para el gel separador durante 1.5-2 horas.

5.2.3. Transferencia a membranas de PVDF

Una vez finalizada la separación de proteínas, éstas se transfirieron de los geles de SDS-PAGE a membranas de PVDF (polifluoruro de vinilideno) Immobilon-P 0.45 µm (Merck Millipore, Billerica, EE.UU.). Previo a la transferencia, las membranas de PVDF, altamente hidrofóbicas, se activaron por un breve paso por metanol y se mantuvieron en tampón de transferencia.

El gel se colocó sobre la membrana de PVDF y, el conjunto, entre 2 capas de papel Whatman y 2 almohadillas. El sistema se introdujo en una carcasa, de tal forma que las proteínas migraran hacia el polo positivo. El tampón de transferencia usado fue 25 mM Tris, 192 mM glicocola, metanol 20 % (v/v). La electrotransferencia fue llevada a cabo con el equipo Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad), con un voltaje constante de 100 V y una resistencia inicial de 350 mA, durante 1 h y en frío.

5.2.4. Bloqueo e incubación con anticuerpos

Finalizada la transferencia, se bloquearon los sitios de unión inespecíficos a proteí-

nas. Para ello, las membranas se incubaron durante 1 h, a T^a ambiente y con agitación suave, en TBS (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5) más Tween-20 0.05 % (v/v) (TTBS); suplementado con 5 % (p/v) de leche en polvo desnatada o BSA al 3 % (p/v), según el anticuerpo de interés con el que se fuese a incubar posteriormente. Generalmente, si se iba a incubar con anticuerpos fosfo-específicos, las membranas se bloqueaban con BSA, ya que la leche en polvo contiene grandes cantidades de fosfo-proteínas como la caseína.

Posteriormente, se retiró la solución de bloqueo y se incubó con el anticuerpo primario diluido en TTBS hasta el día siguiente a 4 °C y con agitación suave. Algunos anticuerpos fueron incubados en solución de bloqueo para reducir el fondo que mostraban durante el revelado. En la [Tabla 10](#) se especifican los anticuerpos utilizados y sus diluciones.

Al día siguiente, la membrana se lavó 3 veces con TTBS durante 30 min en agitación fuerte. Tras los lavados, se incubó con el anticuerpo secundario frente a la fracción constante de la especie correspondiente en la que se hubiese generado el anticuerpo primario, preparado en una solución de TTBS durante 1 h, a T^a ambiente y con agitación suave. Finalmente, se volvió a lavar con TTBS otras 3 veces durante, aproximadamente, 30 min y con agitación fuerte.

5.2.5. Detección de anticuerpos por quimioluminiscencia

Para detectar los anticuerpos secundarios, los cuales están conjugados a peroxidasa de rábano (HRP), las membranas se incubaron con reactivos de quimioluminiscencia ([Tabla 11](#)). La detección se basa en

Anticuerpo	Casa comercial	Origen	Dilución	Uso
Apo A	Abcam, ab7613	IgG <i>rabbit</i>	1:1000	WB
Apo B	Abcam, ab20737	IgG <i>rabbit</i>	1:1000	WB
Apo E	Abcam, ab1906	IgG <i>rabbit</i>	1:1000	WB
B-actina (AC-74)	Sigma-Aldrich, A2228	IgG <i>mouse</i>	1:5000	WB
GCK	Santa Cruz, sc-7908	IgG <i>rabbit</i>	1:500	WB
GFP	Santa Cruz, sc-8334	IgG <i>rabbit</i>	1:100	IF
GLUT1	Millipore, 07-1401	IgG <i>rabbit</i>	1:500	WB
GLUT2	Santa Cruz, sc-7580	IgG <i>goat</i>	1:500	IP
GLUT2	Santa Cruz, sc-9117	IgG <i>rabbit</i>	1:500	WB
GSK3 α /B	Cell Signaling, #5676	IgG <i>rabbit</i>	1:1000	WB
P-GSK3 α /B (Ser ^{21/9})	Cell Signaling, #9331	IgG <i>rabbit</i>	1:1000	WB
GYS2	Cell Signaling, #3893	IgG <i>rabbit</i>	1:1000	WB
p-GYS2 (Ser ^{641/645})	Millipore, #07-817	IgG <i>rabbit</i>	1:1000	WB
IGF-I	Santa Cruz, sc-9013	IgG <i>rabbit</i>	1:200	WB
IGF-II	Santa Cruz, sc-7435	IgG <i>rabbit</i>	1:200	WB
IGF-IRB	Santa Cruz, sc-713	IgG <i>rabbit</i>	1:500	WB
Insulina	Dako, A0564	IgG <i>guinea pig</i>	1:100	IH, IF
IR (cadena β)	Santa Cruz, sc-711	IgG <i>rabbit</i>	1:1000	WB
IRS1	Millipore, #06-248	IgG <i>rabbit</i>	1:500	WB
IRS2	Millipore, #06-506	IgG <i>rabbit</i>	1:500	WB
KI-67	Dako, M7240	IgG <i>mouse</i>	1:200	IH
p44/p42 MAPK	Cell Signaling, #9102	IgG <i>rabbit</i>	1:1000	WB
p-p44/p42 MAPK (Thr ²⁰² /Tyr ²⁰⁴)	Cell Signaling, #9101	IgG <i>rabbit</i>	1:1000	WB
p70S6K	Cell Signaling, #2972	IgG <i>rabbit</i>	1:1000	WB
p-p70S6K (Thr ³⁸⁹)	Cell Signaling, #2971	IgG <i>rabbit</i>	1:1000	WB
PCNA	Santa Cruz, sc-56	IgG <i>mouse</i>	1:100	IF
PKB	Cell Signaling, #9272	IgG <i>rabbit</i>	1:1000	WB
p-PKB (Ser ⁴⁷³)	Cell Signaling, #9271	IgG <i>rabbit</i>	1:1000	WB
p-Tyr	Millipore, 05-947	IgG <i>rabbit</i>	1:500	WB, IP
PYGL	Acris, bs-5011R	IgG <i>rabbit</i>	1:1000	WB
p-PYGL	Universidad de Dundee	IgG <i>rabbit</i>	1:1000	WB
SRB1	Abcam, ab52629	IgG <i>rabbit</i>	1:1000	WB

Tabla 10. Listado de anticuerpos primarios.

WB: *Western blot*, IF: Inmunofluorescencia, IH: Inmunohistoquímica, IP: inmunoprecipitación

Anticuerpo	Casa comercial	Conjugado	Dilución	Uso
<i>Sheep anti-rabbit</i>	GE Healthcare NA931V	HRP	1:5000	WB
<i>Sheep anti-mouse</i>	GE Healthcare NA934V	HRP	1:5000	WB
<i>Rabbit anti-guinea pig</i>	Abcam, ab-6771	HRP	1:200	IH
<i>Goat anti-mouse</i>	Dako, P0447	HRP	1:200	IH
<i>Donkey anti-guinea pig</i>	Jackson (706605148)	Alexa Fluor 647	1:200	IF
<i>Donkey anti-rabbit</i>	Jackson (711545152)	Alexa Fluor 488	1:200	IF
<i>Donkey anti-mouse</i>	Jackson (715095150)	FITC	1:200	IF

Tabla 11. Listado de anticuerpos secundarios.
WB: *Western blot*, IH: inmunohistoquímica, IF: inmunofluorescencia

la reacción catalizada por la HRP, es decir, en la oxidación del luminol en presencia de H_2O_2 y un catalizador a 3-aminoftalato, el cual decae a su estado fundamental emitiendo luz visible (432 nm). Como reactivos se usaron ECL Plus Western Blotting Detection (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) o bien Western Lighting ECL Plus (Perkin Elmer, Waltham, EE.UU.), según las instrucciones del fabricante. Para fijar la señal, se utilizaron las placas de autorradiografía Hyperfilm-ECL (GE Healthcare) y un aparato revelador CURIX 60 (Agfa, Mortsel, Bélgica). Los films fueron posteriormente digitalizados con un escáner.

Alternativamente, se utilizó ChemiDoc XRS+ y el reactivo Immun-Star WesternC (Bio-Rad), un sistema de detección de quimioluminiscencia por cámara CCD, el cual permite la digitalización directa de los resultados.

5.2.6. Borrado de membranas de PVDF

El borrado de la membrana se realizó para poder ver proteínas totales tras haber

revelado con anticuerpos fosfoespecíficos. Este proceso consiste en eliminar el anticuerpo primario y secundario unido a la membrana y dejar libres los epítomos para una nueva hibridación. Para ello, las membranas de PVDF se incubaron con un tampón de borrado (Tris-HCl 62.5 mM, SDS 0.5 % y 2-mercaptoetanol 100 mM, pH 6.8) durante 20 min a 55 °C. Posteriormente se lavaron varias veces en TTBS antes de ser incubadas con un nuevo anticuerpo.

5.3. INMUNOPRECIPITACIÓN

Esta técnica tiene como finalidad la separación de una proteína específica de un extracto de proteínas totales. Una vez realizada la separación, se puede emplear para determinar la actividad enzimática si la proteína aislada es una enzima o bien para detectar posibles interacciones con otras proteínas presentes en la célula.

Para las inmunoprecipitaciones se utilizaron los extractos proteicos obtenidos de la manera antes descrita. Se prepararon

alícuotas de extractos totales que contenían entre 200-1000 µg de proteína (la misma cantidad de proteína total en todas las muestras a analizar en un mismo experimento) en un volumen final de 600-800 µL ajustado con tampón de lisis. A cada muestra se le añadió el anticuerpo correspondiente para inmunoprecipitar (1-2 µg de anticuerpo por cada 1 mg de proteína) y se incubaron en rotación durante toda la noche a 4 °C.

Al día siguiente, para poder recuperar toda la proteína unida al anticuerpo, se añadió al extracto proteico 20-30 µL de una mezcla de proteína A o proteína G-agarosa (Roche) preparada en tampón de lisis (1:1, previamente lavada varias veces con el tampón) y se incubó 2 h a 4 °C en rotación. La proteína A/G se une a las IgG por la fracción constante y, al estar conjugada con bolas de agarosa, sedimentan rápidamente y se pueden separar del resto del sobrenadante, el cual contiene las proteínas que no han sido reconocidas por el anticuerpo utilizado durante la inmunoprecipitación.

A continuación, se centrifugaron a 13.000 rpm durante 15 s para separar los inmunocomplejos de la fracción líquida. La fase sedimentada, que contiene las bolas de agarosa, se lavó varias veces con 500 µL de tampón de lisis y, en el último lavado, se retiró el máximo posible de sobrenadante y se añadió tampón de Laemmli. Las muestras ya preparadas se hirvieron durante 5 min a 95 °C, para eliminar uniones entre proteínas, y se sometieron a un golpe de centrifuga. Los sobrenadantes se cargaron en geles de SDS-PAGE para su detección por WB. Los anticuerpos utilizados se especifican en las [Tablas 10 y 11](#).

6. INMUNOHISTOQUÍMICA E INMUNOFLUORESCENCIA DE SECCIONES PANCREÁTICAS Y HEPÁTICAS

6.1. PREPARACIÓN DE LOS TEJIDOS PARA LAS TINCIONES

6.1.1. Fijación de tejidos y obtención de cortes

Los animales fueron sacrificados como se describe en la [sección 1.6](#). Los páncreas fueron sacados de una pieza, lavados en PBS y fijados en formaldehído al 4 % durante toda la noche. De los hígados, sólo una porción fue fijada en formaldehído. Al día siguiente, los tejidos se lavaron en etanol al 70 % para precipitar las sales formadas por el tampón en el que se encuentra el formaldehído. El tejido se incluyó en bloques de parafina según el protocolo estándar. La fijación del tejido se consiguió mediante su deshidratación en alcoholes de gradación creciente hasta alcohol de 100°. Posteriormente, el tejido se transfirió a xileno, miscible tanto con el alcohol de 100° como con la parafina. Por último se pasó el tejido a parafina previamente licuada en una estufa regulada a 42 °C. Se dieron tres pasos por parafina líquida para favorecer una completa sustitución del líquido intermediario por parafina. Tras la parafinización completa de la muestra, la parafina líquida se vertió en un molde en el que se introdujo la muestra y se dejó solidificar a temperatura ambiente. Los bloques de parafina fueron conservados a 4 °C.

Los bloques de parafina pertenecientes a los páncreas, previamente enfriados, fueron procesados con un microtomo MICROM HM325 (Thermo) obteniéndose cortes de 5 μm que fueron depositados en la superficie de un baño de agua a 55 °C para su completa extensión y, seguidamente, colocados sobre los portaobjetos. Se obtuvieron alrededor de 10 cortes por cada región del bloque. Las secciones se establecieron en intervalos fijos, es decir, para acceder a la siguiente región se descartaron 72 cortes. En total se obtuvieron cortes de 5-6 regiones por páncreas, lo cual posibilitó la aproximación estereológica para el cálculo de masa de célula β .

En el caso de los hígados, siguiendo el mismo protocolo que con los páncreas, sólo se fijó un fragmento del tejido. Se realizaron cortes de 7 μm para las tinciones de hematoxilina y eosina y de 5 μm para las inmunofluorescencias.

6.1.2. Desparafinización e hidratación de cortes

Para eliminar el medio de inclusión, los portaobjetos con los cortes se introdujeron en xilol (2 incubaciones de 10 min), a continuación en etanol absoluto (2 incubaciones de 2 min) y, por último, en una serie de etanoles a concentración decreciente 90, 80, 70 % (v/v), 1 min por cada solución. Seguidamente, los portaobjetos fueron lavados extensivamente con agua corriente. Posteriormente, en los casos es los que se fuese a realizar un inmunomarcado, el tejido se rodeó con un rotulador hidrófobo (*pap-pen*).

6.2. TINCIÓN CON HEMATOXILINA Y EOSINA

Una vez desparafinado el tejido, se tiñen las estructuras ácidas con hematoxilina

durante 15 min. Se realizan 3 lavados de 5 min en H_2O y se tiñen las estructuras básicas con eosina durante 10 segundos. A continuación se deshidratan y montan en DPX.

6.3. INMUNOFLUORESCENCIA EN SECCIONES PANCREÁTICAS O HEPÁTICAS

Las secciones se colocaron en una cámara húmeda y se bloquearon con BSA 4 % (p/v) en PBS a T^a ambiente durante 1 h. En el caso de las secciones pancreáticas, se incubaron con anticuerpo anti-insulina (Dako, Glostrup, Dinamarca) y anticuerpo anti-PCNA F2 (Santa Cruz, Dallas, TX, EE.UU.) diluido en 4 % BSA (p/v) en PBS a 4 °C durante toda la noche ([Tabla 10](#)). Al día siguiente, se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con anticuerpo secundario FITC anti-ratón y Alexa 647 anti-cobaya (Jackson ImmunoResearch, West Grove, EE.UU.) a T^a ambiente durante 1 h ([Tabla 11](#)). Las secciones fueron lavadas de nuevo en PBS e incubadas con DAPI (1:1000) a T^a ambiente durante 10 s. Las preparaciones se montaron con medio de montaje Mowiol (Idibi, Martinsried, Alemania) y fueron observadas en el periodo de una semana. El cálculo de células β en proliferación se expresa como porcentaje de células β PCNA positivas. Se contaron al menos 1500 células β por páncreas.

En el caso de las inmunofluorescencias de GFP en las secciones hepáticas y pancreáticas, el proceso básico fue el mismo, pero fueron incubadas con un solo anticuerpo primario, anti GFP (Santa Cruz), y su correspondiente secundario, Alexa 488 anti-conejo (Jackson ImmunoResearch) ([Tablas 10 y 11](#)).

En todos los casos se realizaron controles positivos y negativos para descartar inespecificidades, descontar el ruido de fondo y calibrar los láseres.

Para la toma de imágenes se utilizó un microscopio de fluorescencia semi-automático Biozero BZ-8000 (Keyence, Osaka, Japón).

6.4 INMUNOHISTOQUÍMICA EN SECCIONES HEPÁTICAS Y PANCREÁTICAS

Las secciones se incubaron durante 10 min en una solución de H_2O_2 al 3 % (v/v) con el fin de bloquear las peroxidasas endógenas. Posteriormente se lavaron 2 veces con ddH_2O y se bloquearon con BSA al 4 % (p/v) en PBS a T^a ambiente durante 1 h y en cámara húmeda. Seguidamente, la solución de bloqueo se reemplazó por anticuerpo primario anti-insulina en el caso del páncreas o Ki-67 en el caso del hígado (Dako) diluido en BSA al 4 % (p/v) en PBS (Tabla 10). Las preparaciones se incubaron a 4 °C durante toda la noche. Al día siguiente, las secciones se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con anticuerpo secundario anti-cobaya o anti-ratón conjugado con peroxidasa (Abcam, Dako respectivamente) diluido en BSA al 4 % (p/v) en PBS a T^a ambiente durante 1 h (Tabla 11). Las secciones fueron lavadas de nuevo en PBS antes de proceder al desarrollo de la imagen mediante el uso de 3,3'-diaminobenzidina en solución de cromógeno (Dako) siguiendo las instrucciones del fabricante. La 3,3'-diaminobenzidina forma un precipitado marrón local al oxidarse en presencia de H_2O_2 y peroxidasa. La reacción se para a los 2-5 min bajo el microscopio, introduciendo las preparaciones en H_2O . Posteriormente, las

secciones se contratiñen con una solución de hematoxilina y se lavan con H_2O . Tras su deshidratación, se montaron en medio DPX. Durante el proceso, se realizaron al mismo tiempo tanto controles negativos como positivos.

7. OBTENCIÓN DE PARTÍCULAS VIRALES

7.1. PRODUCCIÓN DE PARTÍCULAS VIRALES

Para obtener las partículas virales se utilizaron las células empaquetadoras HEK293T (Dharmacon, Lafayette, EE.UU.). La línea HEK293T deriva de la HEK293 (*Human embryonic kidney*). T significa que expresan al antígeno T del SV40 (*Simian Vacuolating Virus 40*) que está implicado en la replicación del genoma viral y es capaz de aumentar la replicación del plásmido en las células transfectadas, obteniéndose de este modo títulos más altos que si se transfectase en células HEK293. Estas células se transfectaron con el vector de interés rAAV junto con el vector de expresión pDG8, el cual contiene elementos críticos para el empaquetamiento de los rAAV como los genes *rep2*, que codifica para las proteínas de replicación, y *cap8*, responsable del empaquetamiento del genoma viral en la cápside de serotipo 8; y los genes E2A y E4 del adenovirus 5 implicados en la replicación y transcripción viral respectivamente (Grimm *et al.*, 2003).

Se sembraron, aproximadamente, 9×10^6 células por placa de 150 mm en medio DMEM completo enriquecido con FBS al 10 %. Al día siguiente, una vez alcanzado

un 60-70 % de confluencia, se cambia el medio por DEMEN completo enriquecido con FBS al 2 %.

Siguiendo las recomendaciones del grupo del Dr Mulligan, el ADN se introdujo en las células HEK293T por medio de transfección con polietilenimina (PEI), un polímero catiónico estable (Boussif *et al.*, 1995). El PEI condensa el ADN en partículas cargadas positivamente que se une a superficies aniónicas de la célula. En consecuencia, los complejos ADN:PEI son endocitados por las células y el ADN se libera en el citoplasma (Sonawane *et al.*, 2003). Las células se transfectaron con los complejos DNA:PEI formados por una mezcla de plásmidos, 20 µg del plásmido pro-AAV y 55 µg del plásmido pDP8.ape (Plasmid Factory GmbH & Co. KG, Bielefeld, Alemania) y PEI 25 kDa (Polysciences, Warrington, PS, EE.UU.) diluido en suero fisiológico y previamente incubados a T^a ambiente durante 30 min (Vanrell *et al.*, 2011). Como control positivo para confirmar que la transfección se había producido y poder calcular además su eficiencia, se transfectó con el plásmido AAV-GFP ya que resulta muy fácil su monitorización. Se consideraron condiciones óptimas cuando se alcanzaba, en 2 días, al menos un 80 % de eficiencia de transfección.

Las células se mantuvieron a 37 °C y, 72 h después de la transfección, se rasparon las células con una espátula y se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 min. El precipitado se resuspendió en 7 mL de tampón de lisis (Tris 0.5 M, NaCl 1.5 M, MgCl₂ 20 mM, Triton X-100 al 1 %, pH 8.5). El sobrenadante se incubó con polietilenglicol (PEG) (Sigma-Aldrich) al 8 % preparado en NaCl 2.5 M durante 72 h a 4 °C. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 2500 rpm durante 20 min a 4 °C. El precipitado obtenido se resuspendió en 7 mL del tam-

pón de lisis mencionado anteriormente. La purificación de sobrenadante y precipitado se realizó por separado. Los 7 mL de sobrenadante o precipitado obtenidos se sometieron a 3 ciclos de congelación/descongelación para liberar los virus del interior de las células, y se centrifugaron a 2500 rpm durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante se trató con nucleasas a 50 U/mL, Benzonase® (Sigma-Aldrich) durante 1 h a 37 °C. Posteriormente se centrifugó a 2500 rpm durante 10 min. Los virus fueron purificados a partir del sobrenadante obtenido tras esta centrifugación.

7.1.1. Purificación de las partículas virales

La purificación de las partículas virales se realizó con gradientes de iodixanol (Opti-Prep™ Density Gradient Medium, Sigma-Aldrich) según el método descrito por Zolotukhin *et al.* 1999. Las soluciones de iodixanol se prepararon según los siguientes porcentajes:

- 17 % (p/v) iodixanol en PBS-MK (MgCl₂ 1 M, KCl 2.5 M en PBS, pH 7.4) con NaCl 5 M.
- 25 % (p/v) iodixanol en PBS-MK con rojo fenol 0.01 µg/µL.
- 40 % (p/v) iodixanol en PBS-MK.
- 60 % (p/v) iodixanol en PBS con rojo fenol 0.01 µg/µL.

El NaCl 5 M incluido en la solución de iodixanol al 17 % previene la agregación de los rAAV con proteínas y permite que se puedan aislar como solo una banda incluida en la capa de iodixanol al 40 %. El rojo fenol debe ir incluido en capas alternas del gradiente para facilitar la visualización de las bandas del gradiente.

Se centrifugó a 69000 rpm, a 16 °C durante 2 h (rotor 70.Ti, Beckman). Se utilizó un programa de aceleración y deceleración lenta (hasta y por debajo de 2000 rpm). Se introdujo una jeringa de 1.2 mm en la interfase de los gradientes 40-60 % para aspirar aproximadamente 4 mL de la capa de la solución al 40 % de iodixanol (fracción transparente entre dos fases coloreadas). La **Figura 21** ilustra de los gradientes de iodixanol antes y después de la centrifugación.

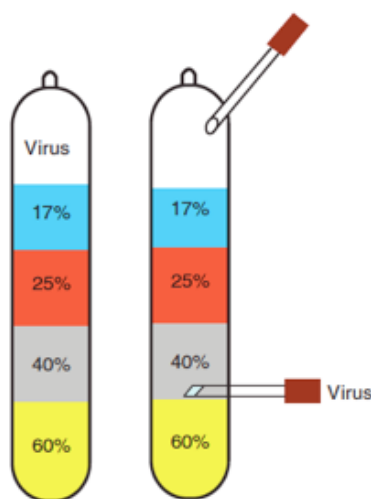


Figura 21. Ilustración de los gradientes de iodixanol antes y después de la centrifugación. Los rAAV se aislaron de la interfase situada entre los porcentajes 40-60 con una jeringa. Para facilitar la extracción, se realizó un agujero también en la parte superior. Modificado de Grieger *et al.*, 2006.

La fracción viral recogida se concentró por ultracentrifugación con tubos Amicon Ultra-15 (Merck Millipore), que contienen membranas PLHK Ultracel-PL, con un límite de hasta 100 kDa. Para ello, la fracción viral recogida se lavó con PBS con sacarosa al 5 % y se centrifugó a 4000 rpm a 16 °C durante 15 min. El rAAV se concentró en un volumen final de aproximadamente 1 mL, del cual, 20 µL, se destinaron a la titulación de las partículas virales y, el volumen restante, fue conservado a -80 °C en alícuotas de 200 µL.

7.2. TITULACIÓN DE LAS PARTÍCULAS VIRALES

El aislamiento de los ácidos nucleicos virales se realizó utilizando el High pure viral nucleic acid kit (Roche) según las instrucciones del fabricante. 20 µL del rAAV se completaron con suero fisiológico hasta alcanzar un volumen final de 200 µL. A la mezcla se añadieron 200 µL de *binding buffer* (guanidina-HCl 6 M, Tris-HCl 10 mM, Triton X-100 (p/v) al 20 %, pH 4.4 suplementado con poli-A a 1 mg/mL) y 50 µL de proteinasa K 20 mg/mL en ddH₂O. Se incubó a 72 °C durante 10 min. Posteriormente se añadieron 100 µL de *binding buffer* y se centrifugó a 8000 x g durante 1 min. Al tubo de polipropileno se le añadieron 500 µL del *inhibitor removal buffer* (guanidina-HCl 5 M, Tris-HCl 20 mM, etanol absoluto al 36 %, pH 6.4) y se centrifugó a 8000 x g durante 1 min. Se hicieron 2 lavados con 450 µL de *wash buffer* (NaCl 20 mM, Tris-HCl 2 mM, etanol absoluto al 80 %, pH 7.5). Se centrifugó una última vez en seco a 13000 x g durante 10 s y se eluyó con 50 µL de ddH₂O centrifugando a 8000 x g durante 1 min.

Los *primers* de la Q-PCR hibridan con el promotor α 1-antitripsina. Los resultados obtenidos por *Real-time* Q-PCR se estandarizaron con el ADN plasmídico también contenido en los rAAV, con cinco muestras estándar entre 10³-10¹⁰ copias por reacción. Se probaron 4 diluciones (1-, 10-, 100-, 1000-veces diluidas) de cada muestra de Q-PCR. Se ensayaron 2 µL tanto de cada estándar como de cada muestra por triplicado, con *primers* a 0.3 µM cada uno, en un volumen total de reacción de 20 µL con 10 µL de SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies). La Q-PCR se desarrolló en un StepOnePlus Real-Time

PCR System (Applied) y en las siguientes condiciones:

95 °C 10 s	}	40 ciclos
60 °C (T _m) 60 s		
72 °C 25 s		
80 °C 10 s		
4 °C final		

Los títulos del genoma del vector se calcularon multiplicando las copias por pocillo por el factor de dilución correspondiente y asumiendo que una copia de doble cadena de ADN plasmídico es equivalente a dos cadenas sencillas del genoma del vector (Sommer *et al.*, 2003).

7.3. ADMINISTRACIÓN DE LOS AAV A LOS ANIMALES

Los AAVs se administraron a ratones de 5 meses de edad por medio de una inyección intravenosa. Para este procedimiento, los animales se anestesiaron con una mezcla de xilacina (Rompun 2 %, Bayer, Leverkusen, Alemania) y ketamina (Imalgene 50, Merial, Lyon, France) al 1:9 v/v y administrada mediante inyección intraperitoneal.

7.4. ENSAYOS DE BIOLUMINISCENCIA

Los ratones se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal de una mezcla de xilacina y ketamina (**apartado 7.3**). El sustrato, luciferina (Promega) disuelta en PBS, se administró por inyección intraperitoneal a una dosis de 150 µg/kg de peso. Tras 10 min, los animales se introdujeron en una habitación oscura para visualización no invasiva de la luz producida por la luciferasa en el ratón a tiempo real (Xeno-

gen IVIS Lumina, Alameda, CA). Las imágenes se cuantificaron y analizaron con el software asociado (Living Image 2.20 software Xenogen). El tiempo de exposición varió entre 1 s y 5 min en función de la intensidad de la luz. La luz emitida se cuantificó como γ/s.

8. TEST METABÓLICOS

8.1 *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA)

Para la cuantificación de la cantidad de insulina en plasma se utilizaron 10 µL de plasma de ratones ayunados durante toda la noche, aproximadamente 16 h. Las muestras se analizaron por duplicado. Para la realización del ELISA siguieron las instrucciones del fabricante (Merck Millipore).

8.2. METABOLISMO GLUCÍDICO

8.2.1 Determinación de la síntesis de glucógeno en cultivo celular

Se sembraron 8x10⁵ células en placas de 6 cm con DMEM alto en glucosa (25 mM) suplementado con FBS al 10 %. Al día siguiente, cuando las células habían alcanzado en torno a un 70-80 % de confluencia, se privaron de suero durante 6 h con medio DMEM a 5 mM de glucosa suplementado con BSA al 0.2 % (p/v). A continuación, el medio se cambió a medio alto en glucosa sin suero y suplementado

con [U-¹⁴C] glucosa (11.1 GBq/μmol) a 10 mmol/L (PerkinElmer, Waltham, EE.UU.) (Alonso-Chamorro *et al.*, 2011). Las células se estimularon con cantidades crecientes de insulina (10-100 nM). Tras 6 h de incubación, las placas se congelaron. Para precipitar el glucógeno, el homogenado se transfirió a papeles Whatman 3 MM (Sigma-Aldrich) con etanol al 66 % (Alonso-Chamorro *et al.*, 2011). Posteriormente, los papeles Whatman se secaron a 40 °C en una estufa. La radiactividad se cuantificó en un contador de radiación β (KB Wallac Rackbeta Liquid Scintillation Counter, Model 1209 from Abbot Laboratories, Libertyville Township, EE.UU.)

8.2.2. Determinación del contenido en glucógeno en cultivo celular y hepático

8.2.2.1. Determinación del contenido en glucógeno en cultivo celular

Se sembraron 2.2×10^6 células en placas de 10 cm con DMEM alto en glucosa (25 mM) suplementado con FBS al 10 %. Al día siguiente, cuando las células habían alcanzado en torno a un 70-80 % de confluencia, se privaron de suero durante 6 h con medio DMEM a 5 mM de glucosa suplementado con BSA al 0.2 % (p/v). A continuación, el medio se cambió a medio alto en glucosa sin suero y las células se estimularon con dosis crecientes de insulina (10-100 nM). Tras 6 h de incubación, las placas se congelaron. Para su análisis, las células se rascaron con un rascador en KOH al 30 % (p/v). Para precipitar el glucógeno, el homogenado se transfirió a papeles Whatman 3 MM (Sigma-Aldrich) con etanol al 66 % (Alonso-Chamorro *et al.*, 2011). Para liberar los monómeros de

glucosa del precipitado de glucógeno, las muestras se incubaron con α-amiloglucosidasa (Sigma-Aldrich) a 1.6 mg/mL durante 4 h a 37 °C en tampón acetato al 0.4 M, pH 4.8. La medición de glucosa se realizó mediante la medida indirecta a 340 nm del NADPH sintetizado con el kit Biosystems D-glucose (Barcelona, España) y según las instrucciones del fabricante.

8.2.2.2. Determinación del contenido en glucógeno hepático

En el caso de la medición de glucosa en hígado, 25 mg de tejido de cada animal se homogeneizaron en KOH al 30 % (p/v) y se calentaron a 100 °C. A continuación se llevó a cabo el mismo protocolo que en el apartado anterior. Para la realización de estos experimentos, los animales se sacrificaron tras ser ayunados 16 h seguido de 1 h de alimentación.

8.2.3 Determinación de la actividad de la glucógeno sintasa hepática

Se sembraron 2.2×10^6 células en placas de 10 cm con DMEM alto en glucosa (25 mM) suplementado con FBS al 10 %. Al día siguiente, cuando las células habían alcanzado en torno a un 70-80 % de confluencia, se privaron de suero durante 6 h con medio DMEM a 5 mM de glucosa suplementado. A continuación, el medio se cambió a medio alto en glucosa sin suero y las células se estimularon con insulina a 10 nM durante 15 min. Se midió la formación de glucógeno en situación basal y tras 15 min de estimulación con insulina a 10 nM según se describe en el **apartado 8.2.2.1**. La actividad se halló según los moles generados por minuto (U) referidos a los mg de proteína total. Para los

cálculos se tuvo en cuenta la fracción de glucosa presente previo a la digestión con α -amiloglucosidasa.

8.2.4. Determinación de la actividad de la glucógeno fosforilasa hepática

Se sembraron 2.2×10^6 células en placas de 10 cm con DMEM alto en glucosa (25 mM) suplementado con FBS al 10 %. Al día siguiente, cuando las células habían alcanzado en torno a un 70-80 % de confluencia, se privaron de suero durante 6 h con medio DMEM a 5 mM de glucosa suplementado durante 4 y 6 h. Se midió por colorimetría la formación de glucosa-1-fosfato en ambas condiciones según las instrucciones del kit Glucose-1-Phosphate Colorimetric Assay Kit (BioVision, Milpitas, CA, EEUU). La actividad se halló según los moles generados por minuto (U) referidos a los mg de proteína total.

8.3. METABOLISMO LIPÍDICO

8.3.1. Aislamiento y purificación del total de los lípidos hepáticos

Se pesaron 100 mg de tejido hepático. Se homogeneizaron en 3 mL de PBS durante 45 s con ayuda de un Ultra-Turrax T10 basic (IKA). El aislamiento se llevó a cabo según el método de extracción de Folch (Folch *et al.*, 1957). Se agregaron 12 mL de una mezcla de 2:1 cloroformo:metanol y se agitó. Se centrifugaron para separar las fases a 3000 rpm durante 10 min. La fase orgánica (inferior) se transfirió a un vial de centelleo de 20 cm³. El cloroformo se evaporó con gas nitrógeno y se resuspendió en Triton X-100 al 15 % en cloroformo. El

cloroformo se evaporó de nuevo con nitrógeno gas y los lípidos se resuspendieron en 2 mL de ddH₂O.

8.3.2. Ensayos colorimétricos para la medida de colesterol y triglicéridos

Para la determinación de colesterol se utilizaron 20 μ L de suero o de la mezcla total de lípidos hepáticos extraída. La medida se realizó mediante un ensayo colorimétrico con el kit de colesterol total de Wako (Saitama, Japón) según las instrucciones del fabricante. La determinación de colesterol total de este kit se basa en el uso de tres enzimas: colesterol esterasa (CE), colesterol oxidasa (CO) y peroxidasa (POD). El colesterol esterificado, se desesterifica por la CE y, al ser oxidado por la CO, se desprende una molécula de H₂O₂. La mezcla de fenol y 4-aminoantipirina (4-AA) se condensa por acción del H₂O₂, formando una quinonaimina coloreada proporcional a la concentración de colesterol en la muestra.

Para la determinación de los triglicéridos se utilizaron 3 μ L de suero o de la mezcla total de lípidos hepáticos extraída diluida 10 veces. La medida se realizó mediante un ensayo colorimétrico con el kit de triglicéridos (Infinity, Thermo Fisher) según las instrucciones del fabricante. La determinación de triglicéridos de este kit se basa en el uso de tres enzimas: lipasa (LP), glicerol quinasa (GK) y glicerolfosfato oxidasa (GPO). Los triglicéridos son hidrolizados por la lipasa a glicerol y ácidos grasos libres. Como resultado de la acción de la GK, el glicerol pasa a ser fosforilado en su posición 3. Cuando el glicerol-3-fosfato es oxidado por la GPO se desprenden 2 moléculas de H₂O₂. La mezcla de fenol y 4-aminoantipirina (4-AA) se condensa por acción del H₂O₂, formando una quinonai-

mina coloreada 2 veces concentrada en relación a la cantidad de triglicéridos de la muestra.

8.3.3. Cromatografía líquida de separación rápida de proteínas (*Fast protein liquid chromatography*, FPLC)

Por cada grupo de animales (n=5 por grupo) se utilizó un *pool* de plasma (volumen total de 250 μ L). Para la cromatografía se utilizaron 2 columnas en serie de *Sepharose 6* con un tamaño de partícula de entre 45 y 165 μ m (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Reino Unido). El tampón de elución utilizado fue Tris a 100 mM y NaN_3 al 0.04 %, pH 7.5. La velocidad de elución (*flow rate*) fue de 0.7 mL/min.

9. OTRAS TÉCNICAS

9.1 CUANTIFICACIÓN

9.1.1. *Blots*

Los *blots* fueron cuantificados usando la herramienta *Analyze\Gels* de ImageJ. Se seleccionaron regiones rectangulares de igual área para todos los puntos del *blot*, de tal forma que se obtuvieron representaciones de la densidad de la señal a lo largo de la región seleccionada. Se dibujó una línea base y se calculó el área bajo la curva, indicativa de la señal relativa a cada punto. Los resultados fueron siempre normalizados con la señal del control invariable en cada caso.

9.1.2. Imágenes de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

Las imágenes de las inmunohistoquímicas de las secciones pancreáticas se adquirieron con una cámara digital (XCD-U100CR, Sony, Tokyo, Japón) acoplada a un microscopio invertido (Eclipse 8i, Nikon, Tokio, Japón). Los análisis morfométricos se realizaron con un software de análisis automático de imágenes (Histolab, Microvision Instruments, Gotenburgo, Suecia). La selección automática fue corregida manualmente para eliminar defectos o áreas de tejido graso. La fracción del área total de célula β se determinó calculando la relación entre el área de células positivas para la tinción de insulina frente al área total de células pancreáticas. Se contó el número total de islotes por sección. La medida del área de los islotes (en μm^2) y su clasificación en función de ésta permitió el estudio de su distribución según su tamaño.

9.2. ESTADÍSTICA

Los datos se representan como media \pm SEM de, al menos, 3 experimentos independientes. En cuanto a los experimentos *in vivo*, se utilizaron como mínimo 4 ratones. Las pruebas estadísticas entre valores medios fueron determinadas mediante el test *t* de Student para comparación de dos muestras independientes (*prueba-t desapareada*, usada en la práctica totalidad de análisis realizados en esta tesis). El análisis simple de la varianza mediante ANOVA de una vía fue utilizado para comparaciones múltiples seguido del test de Bonferroni. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas para $P < 0.05$.

9.3. TÉCNICAS BIOINFORMÁTICAS

9.3.1. Trabajo con secuencias de ADN

- **BLAST** (National Institutes of Health, Bethesda, EE.UU.) <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> **Primer-BLAST** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)

Diseño de *primers* y comparación de secuencias con las bases de datos del NIH.

- **LabLife** (<http://www.lablife.org>)

Trabajo con enzimas de restricción, predicción de puntos de corte dentro de una secuencia.

- **Vector NTI**, ThermoFisher. Alineamiento de secuencias de ADN y aminoácidos.

9.3.2 Trabajo con imágenes

- **Adobe Photoshop CS6** (Adobe, San José, EE.UU.) Ajustes de imágenes.
- **ImageJ** (National Institutes of Health) Software gratuito usado para análisis de imágenes (área), y densitometría de *blots*.
- **Image Analysis Software** (Histolab). Análisis morfométricos.

- **PANREAC**: ácido acético, etanol, glicerol, glicina, HCl, isopropanol, metanol y NaCl.

- **PRONADISA** (TORREJÓN DE ARDOZ, ESPAÑA): agar bacteriológico, agarosa, extracto de levadura y triptona.

- **ROCHE**: aprotinina, leupeptina y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF).

- **SIGMA-ALDRICH**: anfotericina B, ampicilina, DAPI, DMSO, EDTA, estreptomycin, HEPES, kanamicina, 2-mercaptoetanol, NaF, paraformaldehído, penicilina G, SDS y Tris base (Trizma).

10. MATERIALES

Los reactivos comunes de laboratorio son de las siguientes casas comerciales:

- **MERCK MILLIPORE**: Triton X-100 y Tween-20.

07/

resultados

MODELO iLIRKO COMO MODELO DE PROGRESIÓN A LA DIABETES TIPO 2

El modelo iLIRKO se generó para estudiar el papel específico del receptor de insulina en hígado en la resistencia a insulina y, por tanto, en la progresión a la diabetes tipo 2. El abordaje inducible evita los efectos colaterales que supone la eliminación del receptor durante el desarrollo embrionario del animal ya descritos por Michael *et al.* en el 2000 en el modelo LIRKO. El modelo iLIRKO se obtuvo cruzando animales que portaban el exón 4 del gen que codifica para el receptor de insulina flanqueado por secuencias loxP con animales en los que la recombinasa Cre, fusionada con receptores de estrógenos truncados y dependientes de tamoxifeno para su activación (Cre-ER^{T2}), se encontraba localizada bajo el control del promotor de albúmina (Alb), específico de hepatocitos. Así, mientras en el alelo Alb-Cre se expresaba funda-

mentalmente en hepatocitos, también había un mínimo de expresión en tejidos extrahepáticos. Sin embargo, la fusión de Alb-Cre-ER^{T2} se detecta únicamente en el hígado (Schuler *et al.*, 2004) (Figura 22).

El alelo Alb-Cre-ER^{T2} fue mantenido en heterocigosis (Alb-Cre^{+/-}) en hembras (Alb-Cre^{+/-}, *Insr*^{loxP/loxP}). Los alelos de IR con el exón 4 flanqueado por secuencias loxP fueron mantenidos siempre en homocigosis (*Insr*^{loxP/loxP}). Por tanto, para la obtención del modelo iLIRKO se cruzaron machos (*Insr*^{loxP/loxP}) con hembras (Alb-Cre^{+/-}, *Insr*^{loxP/loxP}), obteniéndose un 50 % de machos control *Insr*^{loxP/loxP} y un 50 % de machos Alb-Cre^{+/-}; *Insr*^{loxP/loxP} según las leyes mendelianas (Figura 23).

La inducción de la translocación de la Cre-ER^{T2} al núcleo se consigue en 2004 mediante la administración, por inyecciones intraperitoneales, de 1 mg de tamoxifeno (Schuler *et al.*, 2004) (Figura 24). A

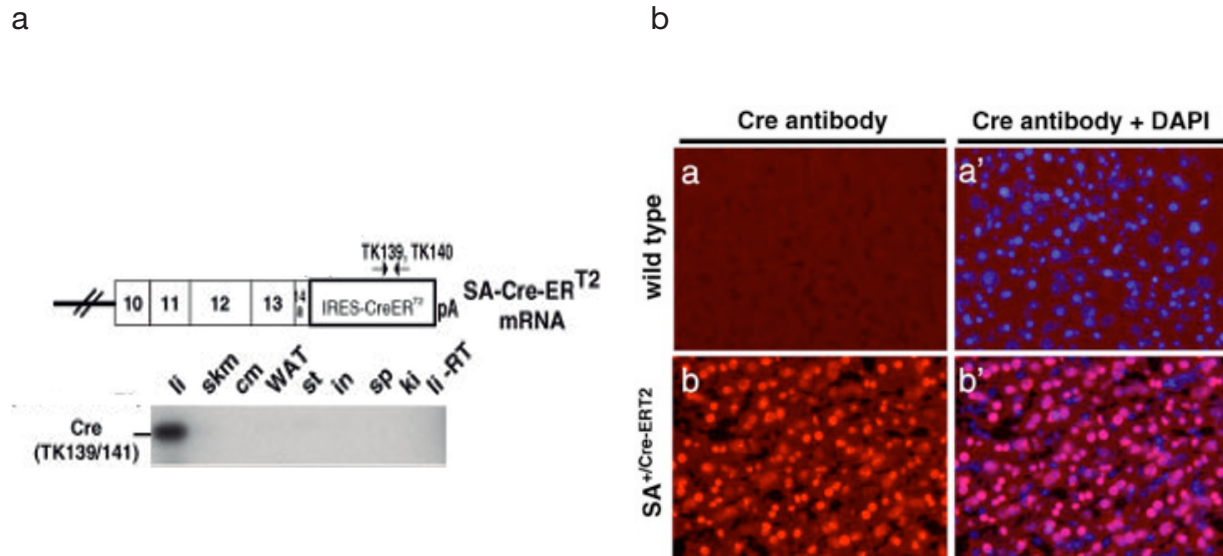


Figura 22. Análisis de la expresión génica y proteica de Cre-ER^{T2}.
a: Detección del ARNm de la albúmina sérica (SA) del transcrito fusionado SA-Cre-ER^{T2} por RT-PCR del ARN de diferentes órganos de los animales SACre-ER^{T2} de 8 semanas de edad. Se indican los primers utilizados para la amplificación. Li: hígado, skm: músculo esquelético, cm: músculo cardíaco; WAT: tejido adiposo blanco, st: estómago, in: intestino, sp: bazo, ki: riñón, li-RT: control hepático sin transcriptasa reversa. b: Análisis inmunohistoquímico de la expresión de la Cre-ER^{T2} en el hígado. El análisis se realizó en secciones hepáticas de ratones de 8 semanas tratados con tamoxifeno *wildtype* (paneles superiores) o SACre-ER^{T2} (paneles inferiores). El color rojo corresponde a la tinción de la recombinasa Cre-ER^{T2}, el color azul corresponde a la señal del DAPI. El color magenta es la superposición de rojo y azul de la señal de la Cre y del DAPI, respectivamente. Modificado de Schuler *et al.*, 2004.

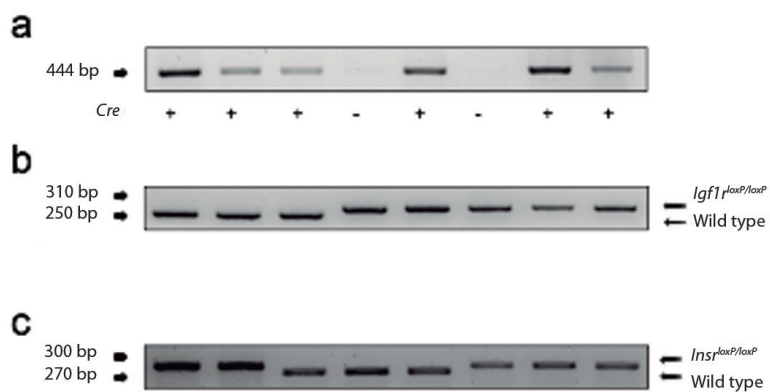


Figura 23. Análisis de la expresión génica de Cre-ER^{T2}, *Insr*^{loxP/loxP} o *Igf1*^{loxP/loxP}.
a: Detección del ADN del Cre-ER^{T2} por PCR en el ADN de la cola de los ratones ratones Alb-Cre^{+/+} o Alb-Cre^{-/-}.
b: Detección de las secuencias loxP por PCR en el ADN de la cola de los ratones ratones *Insr*^{loxP/loxP} o *wild type*.
c: Detección de las secuencias loxP por PCR en el ADN de la cola de los ratones ratones *Igf1*^{loxP/loxP} o *wild type*.
En todos los casos, el ADN de la cola se extrajo a las 6 semanas de edad. Los *primers* utilizados para la amplificación se especifican en la [Tabla 5](#).

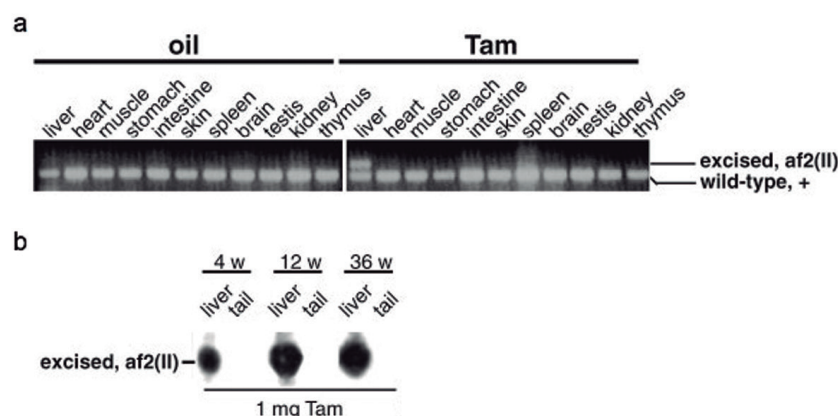


Figura 24. Cre-ER^{T2} media la escisión del ADN flanqueado por secuencias loxP.

a: Análisis del DNA genómico de los tejidos indicados de ratones SACre-ER^{T2}/af2 tratados con aceite de girasol o con 1 mg de tamoxifeno. Se muestran los productos de la PCR específicos para Cre-ER^{T2}.

b: Análisis por *Southern blot* del ADN del hígado y la cola en animales tratados con 1 mg de tamoxifeno. Se indica la edad del ratón al comienzo del tratamiento con tamoxifeno. Modificado de Schuler *et al.*, 2004.

lo largo de los años, se han publicado diferentes abordajes: diferentes vías de administración del tamoxifeno o 4-hidroxitamoxifeno, oral o intraperitoneal, en varias dosis y diferentes tiempos resumidos en la [Tabla 12](#) (Kühbandner *et al.*, 2000; Madisen *et al.*, 2010; Schuler *et al.*, 2004; Whitfield *et al.*, 2015). Así, para inducir la translocación de la Cre-ER^{T2} citoplasmática al núcleo e inducir la escisión del exón 4 del *Insr*, se probaron diferentes protocolos resumidos en la [Figura 25](#).

TRATAMIENTO	COMPUESTO	DOSIS (mg)	NÚMERO DE DOSIS	PREPARACIÓN
Inyección intraperitoneal	4OHT	1	3 (alternativas)	Aceite girasol
			5	10% EtOH, Aceite girasol
	Tamoxifeno	1	3 (alternativas)	Aceite girasol
			5	Aceite girasol
Cánula	Tamoxifeno	10(x2) 5(x1)	3 (alternativas)	10% EtOH, Aceite girasol
Dieta	Tamoxifeno		14	

Tabla 12. Resumen de los tratamientos probados para la activación de la Cre-ER^{T2}.

Para examinar los efectos que provocan las distintas dosis, número de administraciones y modo de preparación del tamoxifeno y 4-OHT, variamos estos parámetros en ratones de 8 semanas (Schuler *et al.*, prueban que la delección es independiente de la edad del animal, [Figura 24b](#)), nunca más pequeños de 20 g, y examinamos el resultado de la actividad de la recombinasa Cre. Se analizaron los hígados de los ratones 30 días después de la administración intraperitoneal de 1 mg de 4-OHT preparado en aceite de girasol durante 5 días consecutivos o 3 días alternativos. Los resultados de la RT-PCR muestran que la delección del exón 4 del *Insr* es de aproximadamente un 50 % en comparación con los ratones control inyectados sólo con el vehículo. Sin embargo, los niveles de IRβ en hígado son similares a los del control. Lo mismos resultados se obtienen cuando inyectamos con tamoxifeno, en vez de 4-OHT, en las mismas condiciones. Aunque está descrito que una dosis intraperitoneal de tamoxifeno de 0.1 mg/día durante 5 días induce una escisión eficiente en la mayoría de los genes diana flanqueados por secuencias loxP, para *loci* de difícil acceso son necesarias

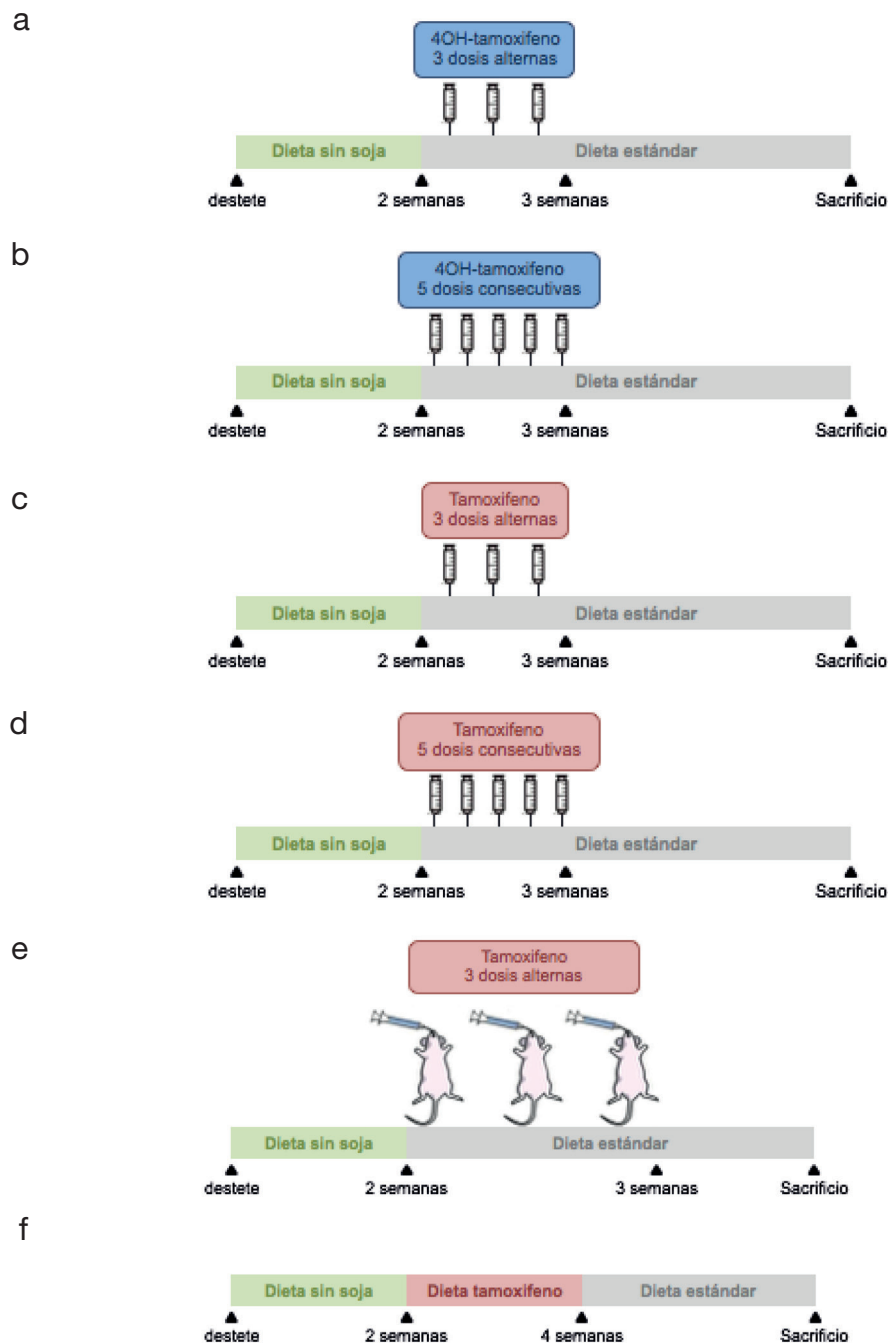


Figura 25. Abordajes ensayados para la activación de la Cre-ERT2.

En todos los casos, tras el destete se alimenta a los ratones durante 2 semanas con dieta libre en soja. Si la administración de 4OH-tamoxifeno o tamoxifeno es mediante inyección, tras la dieta libre en soja los animales pasarán a alimentarse con dieta estándar hasta su sacrificio. a: Se administran 3 dosis alternas de 4OH-tamoxifeno. Sumadas las 3 dosis se inyecta en total 1 mg de 4OH-tamoxifeno. b: Se administran 5 dosis consecutivas de 4OH-tamoxifeno. Sumadas las 5 dosis se inyecta en total 1 mg de 4OH-tamoxifeno. c: Se administran 3 dosis alternas de tamoxifeno. Sumadas las 3 dosis se inyecta en total 1 mg de tamoxifeno. d: Se administran 5 dosis consecutivas de tamoxifeno. Sumadas las 5 dosis se inyecta en total 1 mg de tamoxifeno. e: Se administran 3 dosis alternas de tamoxifeno. Sumadas las 3 dosis, el animal ingiere en total 5 mg de tamoxifeno. (a-e) La administración de 4OH-tamoxifeno y tamoxifeno mediante inyección se realizó a los animales Cre-ERT2 positivos, mientras que a los controles se les inyectó el vehículo en que se había disuelto el 4OH-tamoxifeno o tamoxifeno. e: Tras 2 semanas de dieta libre en soja, los animales se alimentaron con dieta de tamoxifeno durante otras 2 semanas. A continuación y hasta su sacrificio, se alimentaron con dieta estándar. En este caso todos los animales, incluidos los Control, se alimentaron con los tres tipos de dietas.

dosis más altas. Este problema puede sortearse mediante la administración de tamoxifeno durante un periodo más largo, mejor que aumentando la dosis diaria ya que dosis mayores a 0.8 mg de tamoxifeno vía intraperitoneal han sido descritas como saturantes para algunas proteínas acopladas a ER^{T2} (Metzger y Chambon, 2011; Wilson *et al.*, 2014). Sin embargo, las inyecciones continuadas causan problemas derivados de la acumulación de aceite en la cavidad intraperitoneal (Wilson *et al.*, 2014). Por tanto, teniendo en cuenta nuestros resultados en los que parece

go, los niveles de proteína se reducen en, aproximadamente, un 80 % respecto a los ratones Control (Figura 26). Una vez más, teniendo en cuenta los resultados debíamos recurrir a periodos de administración más largos. Para ello decidimos recurrir a la administración de tamoxifeno por medio de la dieta, aproximación más fisiológica, saludable y éticamente correcta. Los animales se alimentaron durante 15 días con dieta de tamoxifeno, para minimizar cualquier efecto nocivo de éste, aunque ratones alimentados durante 18 semanas con dieta de tamoxifeno no presentan altera-

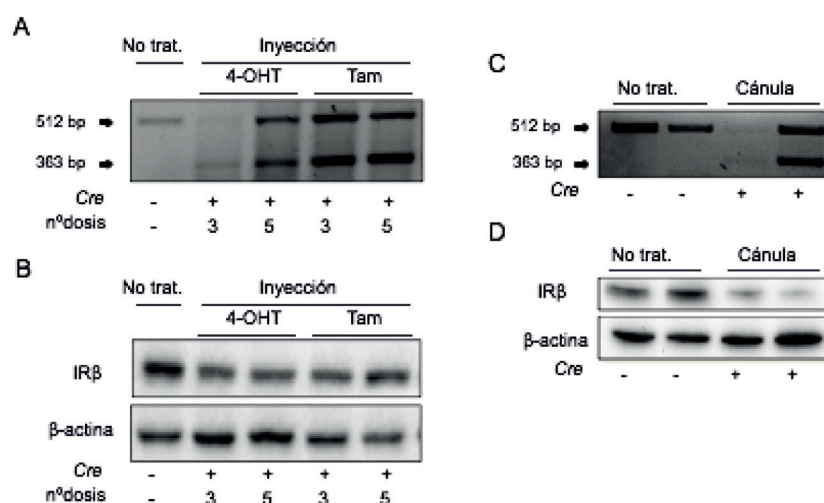


Figura 26. Evaluación de los diferentes métodos para la inducción de Cre-ERT2.

a: Deleción del exón 4 del *Insr* mediante RT-PCR en homogeneizados totales hepáticos de ratones de 5 meses de edad Control e iLIRKO. Se prueba la inyección intraperitoneal en 3 ó 5 dosis de 4OH-tamoxifeno (4-OHT) o tamoxifeno (Tam). b: Evaluación de los niveles de IRβ en homogeneizados totales hepáticos por Western blot de los mismos ratones descritos en el apartado anterior (a). Se utiliza la β-actina como control de carga. c: Deleción del exón 4 del *Insr* mediante RT-PCR en homogeneizados totales hepáticos de ratones de 5 meses de edad Control y iLIRKO. Se prueba la administración de 3 dosis de tamoxifeno (Tam) con cánula intragástrica. b: Evaluación de los niveles de IRβ en homogeneizados totales hepáticos por Western blot de los mismos ratones descritos en el apartado anterior (c). Se utiliza la β-actina como control de carga.

que la dosis administrada era insuficiente, decidimos recurrir a la administración oral mediante una cánula intragástrica. En este caso, los ratones se sacrificaron 30 días después de la última inyección. Los resultados de la RT-PCR muestran que los niveles de deleción del exón 4 del *Insr* en extractos hepáticos totales son de aproximadamente el 50 % respecto al control al cual se administró exclusivamente el vehículo, aceite de girasol. Sin embar-

ciones en ninguno de sus tejidos (Wilson *et al.*, 2014). Previamente y tras el destete, los animales fueron alimentados con dieta libre en soja para disminuir los niveles de fitoestrógenos que podrían competir con el tamoxifeno por la unión a los receptores de estrógenos. A continuación de la dieta de tamoxifeno, los animales fueron alimentados con dieta estándar hasta su sacrificio (Figura 25f).

Para cuantificar el grado de delección del exón 4 del *Insr* alcanzado en los hepatocitos tras 15 días de dieta con tamoxifeno, se diseñó una pareja de *primers* en la cual el *forward* hibridaba en el intrón 3-4 y el *reverse* en el exón 4 dando lugar a un producto de 126 pb. Esta aproximación nos permitió cuantificar cuánto IR total expresaban los animales en el hígado. El ADN genómico del *pool* total del hígado se analizó mediante qPCR para la expresión del *Insr*. Los resultados muestran un descenso significativo de, aproximadamente, el 75 % en ratones iLIRKO en comparación con ratones Control. La delección del exón 4 del *Insr* es hepatoespecífica ya que está bajo el control del promotor de la albúmina, por lo que no se produce delección en el resto de células presentes en el hígado, como las células de Kupffer, Ito o endoteliales. Este hecho explica en parte el porcentaje de células no delecionadas que encontramos en los animales iLIRKO (Figura 27). La delección del exón 4 del *Insr* se comprobó también por RT-PCR en RNA mensajero de animales Control e iLIRKO.

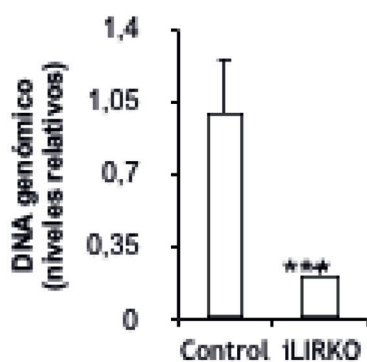


Figura 27. La dieta con tamoxifeno causa la delección del exón 4 del *Insr* en hepatocitos. El ADN genómico de ratones de 5 meses de edad se aisló del hígado y se analizó mediante qPCR. Los datos se presentan como media \pm SEM para cada grupo. La significación estadística se representa como Control vs iLIRKO *** ($p < 0.001$).

Tal y como se esperaba, no hay escisión del exón 4 del *Insr* flanqueado por secuencias loxP en los hígados de animales Control. Sin embargo, en animales iLIRKO se produce la escisión del exón 4 del *Insr* exclusivamente en el hígado de animales tratados con tamoxifeno, pero no en otros tejidos (Figura 28). Por tanto, la expresión de la Cre-ER^{T2} específicamente en un tipo celular en ratones transgénicos permite una eficiente recombinación mediada por la Cre e inducida por tamoxifeno sin recombinación espontánea en ausencia de tamoxifeno (Metzger *et al.*, 2011).

Analizamos los niveles de expresión de IR en homogeneizados totales hepáticos de animales Control e iLIRKO mediante *Western blot* utilizando anticuerpo frente a la cadena β del IR. Los resultados muestran de nuevo la eliminación específica del IR

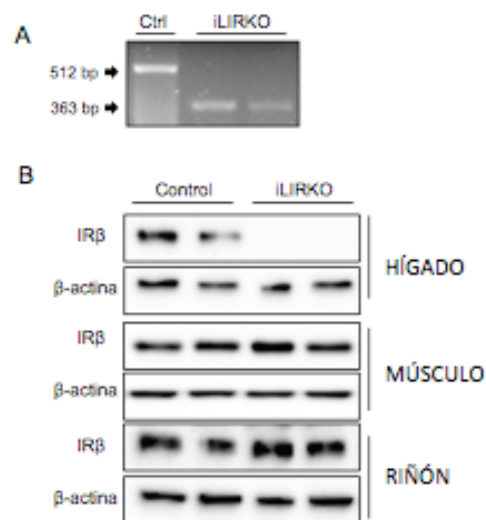


Figura 28. La dieta con tamoxifeno es el método más efectivo para la inducción de Cre-ER^{T2}. **a:** Análisis de la delección del exón 4 del *Insr* mediante RT-PCR en homogeneizados totales hepáticos de ratones de 5 meses de edad Control e iLIRKO. Se sigue el esquema de dietas explicado en la Figura 4f. **b:** Evaluación de los niveles de IR β en homogeneizados totales hepáticos musculares o renales por *Western blot* en ratones de 5 meses de edad Control e iLIRKO. Se utiliza la β -actina como control de carga.

en el hígado de los ratones iLIRKO, pero no en otros tejidos. Como control de carga se utilizó la β -actina (Figura 28).

La inducción de la pérdida del receptor de insulina no está asociada con cambios en la morfología hepática. Los análisis histológicos con hematoxilina/eosina a los 5 meses de edad muestran una arquitectura hepática normal, con signos no evidentes de núcleos hiperproliferativos o esteatosis en ratones iLIRKO. Estos resultados fueron validados por el servicio de anatomía patológica del hospital Santa Cristina de Madrid. Además no hay cambios significativos en el peso de los hígados de los ratones control en comparación con los ratones iLIRKO (Figura 29).

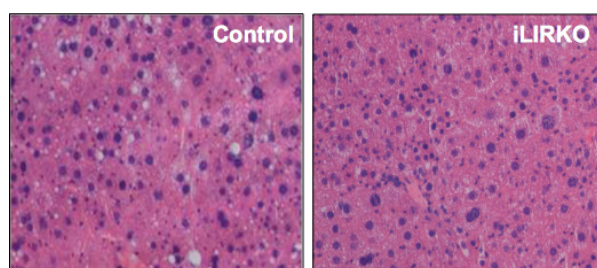


Figura 29. La delección inducible del receptor de insulina tras el desarrollo embrionario no causa daño hepático. Se muestra una tinción con hematoxilina/eosina representativa de secciones hepáticas de ratones Control (panel izquierdo) e iLIRKO (panel derecho). Aumento 20X.

LA DEFICIENCIA DEL RECEPTOR DE INSULINA EN HÍGADO PROVOCA UNA MARCADA INTOLERANCIA A GLUCOSA Y RESISTENCIA A INSULINA

Los efectos fisiológicos que provoca la deficiencia del receptor de insulina en hígado son patentes ya a los 3 meses de edad. El test de tolerancia a glucosa (GTT) muestra una significativa intolerancia a la glucosa a los 3 meses de edad que se

mantiene a los 6 y 9 meses, en animales iLIRKO en comparación con animales Control. En cuanto al test de tolerancia a insulina (ITT), los ratones iLIRKO a los 3 meses de edad eran resistentes a la insulina administrada de forma exógena. Igual que ocurría en la GTT, los efectos significativos en las ITT de los ratones iLIRKO persistían a los 6 y 9 meses de edad en comparación con los ratones Control (Figura 30).

Además, estos animales desarrollan una severa hiperinsulinemia, debido a la secreción compensatoria de insulina por parte del páncreas y a la falta de eliminación de ésta de la circulación debido a la falta de receptores de insulina en hígado. Por ello, decidimos caracterizar la masa de célula β en ratones Control e iLIRKO de 9 meses de edad. De acuerdo con la hiperinsulinemia descrita, las tinciones de las secciones pancreáticas con insulina muestran un incremento significativo, aproximadamente de un 50 %, de la masa de célula β de los ratones iLIRKO en comparación con los ratones Control ya que aumenta significativamente el número de islotes, aunque no se modifica la distribución por tamaños en comparación con los ratones Control (Figura 31). De acuerdo con trabajos previos, estos resultados indican que la señalización del IR hepático es necesaria para el mantenimiento de la homeostasia glucídica (Michael *et al.*, 2000).

GENERACIÓN DE LOS rAAVs QUE CONTIENEN LAS ISOFORMAS DEL RECEPTOR DE INSULINA

Para conocer la importancia de cada isoforma del IR en el hígado en la regulación de la homeostasia glucídica total, generamos virus adenoasociados del serotipo 8

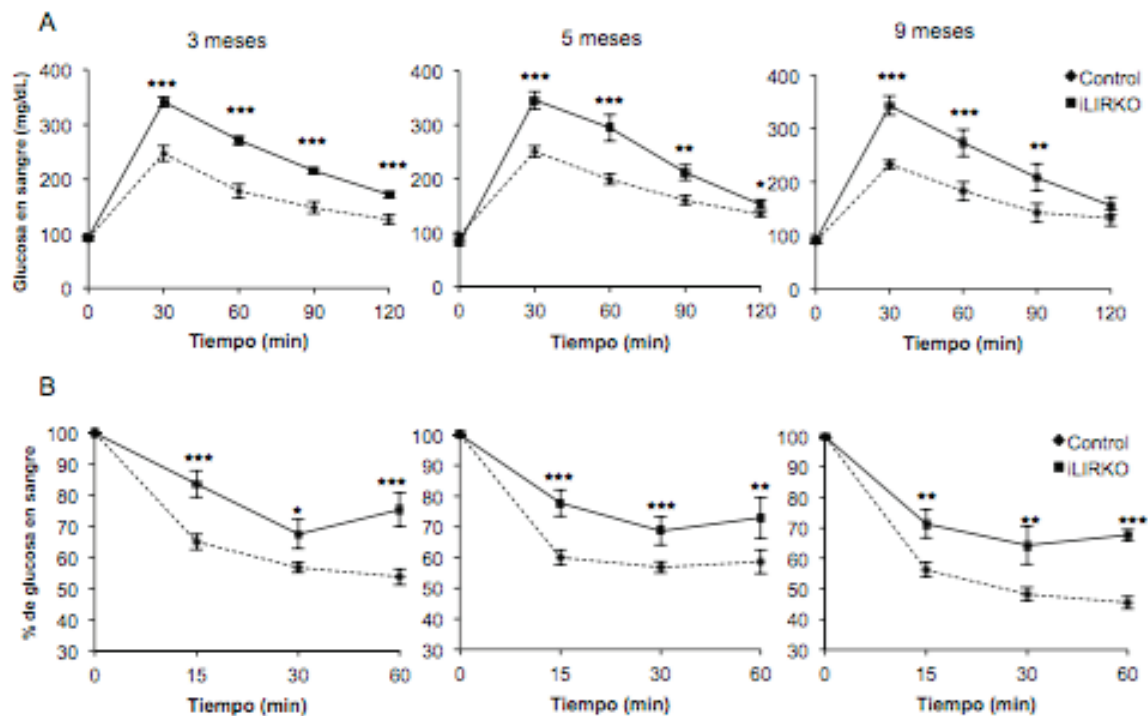


Figura 30. Efectos metabólicos de la eliminación del receptor de insulina en el hígado.

a: Test de tolerancia a glucosa intraperitoneal en ratones Control e iLIRKO de 3, 5 y 9 meses de edad (n=10-12 animales por grupo). **b:** Test de tolerancia a insulina intraperitoneal en ratones Control e iLIRKO de 3, 5 y 9 meses de edad (n=10-12 animales por grupo). Los datos se presentan como media \pm SEM para cada grupo. La significación estadística se representa como Control vs iLIRKO * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$).

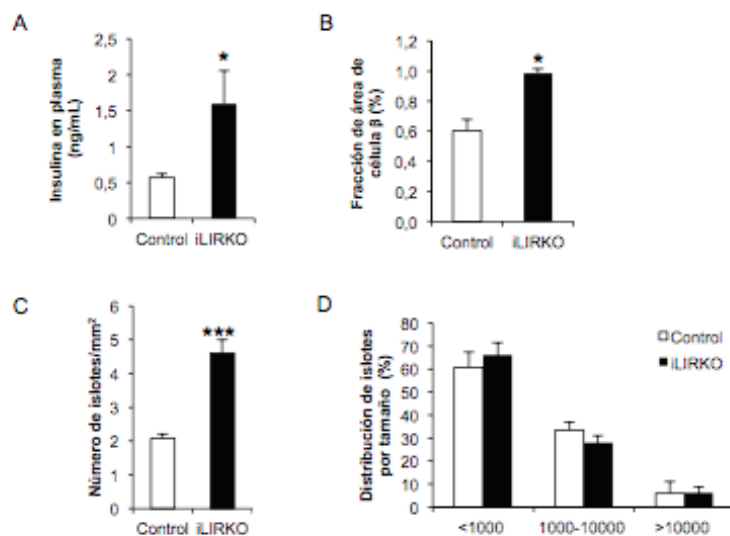


Figura 31. Los ratones iLIRKO desarrollan una marcada compensación por parte de la célula β pancreática.

a: Niveles de insulina en plasma en ratones Control e iLIRKO de 5 meses de edad (n=10-12 ratones por grupo).

b: Área media del islote.

c: Densidad de islotes.

d: Distribución de los islotes por tamaño, en ratones Control e iLIRKO de 9 meses de edad (n=5 ratones por grupo). Los datos se presentan como media \pm SEM para cada grupo. La significación estadística se representa como Control vs iLIRKO * ($p < 0.05$), *** ($p < 0.001$).

que contenían las isoformas humanas del receptor de insulina *INSR A* o *INSR B* o los genes marcadores luciferasa (*luc*) o proteína verde fluorescente (*GFP*). Estos genes se encontraban bajo la regulación de un promotor hepatoespecífico, α 1-antitripsina (*AAT*) y flanqueados por repeticiones terminales invertidas (*ITR*) del serotipo 2 (Figura 32). El vector que contiene el gen de la luciferasa se obtuvo del plásmido *pdLucFXR*, cedido por la Dra. González-Aseguinolaza (número de acceso Gene Bank AY603759) utilizando *EcoRI* y *PmlI*. Lo mismo para la obtención del vector que contiene *GFP* (número de acceso Gene Bank L29345).



Figura 32. Diagrama esquemático de los vectores de los AAV utilizados en esta tesis.

pAAT: promotor α -1 antitripsina humano, *GFP*: gen de la proteína verde fluorescente, *IRA/B*: *INSR A* o *B*, *ITR*: repeticiones terminales invertidas, *luc*: gen de la luciferasa, *poliA*: señales de poliadenilación. **d**: Distribución de los islotes por tamaño, en ratones Control e *iLIRKO* de 9 meses de edad ($n=5$ ratones por grupo). Los datos se presentan como media \pm SEM para cada grupo. La significación estadística se representa como Control vs *iLIRKO* * ($p < 0.05$), *** ($p < 0.001$).

Para generar los virus adenoasociados que contenían una u otra isoforma del receptor de insulina llevamos a cabo numerosas estrategias ya que el gran tamaño de los receptores (4146 pb *IRA* y 4182 pb *IRB*) supuso una dificultad a la hora de insertarlos entre las secuencias *ITR*. Además, a las secuencias propias de los receptores debe sumársele, como mínimo, las bases correspondientes al promotor y la cola *polyA*. El primer paso fue caracterizar el material de partida. Así,

secuenciamos el ADN plasmídico de *IRA* e *IRB* con los *primers* especificados en la Tabla 9. También digerimos los plásmidos con endonucleasas de restricción para cerciorarnos de que la secuencia con la que trabajábamos era la correcta. Así, digerimos 10 μ g de cada plásmido con *BamHI* (20 U/ μ L) o *BstXI* (10 U/ μ L). Los fragmentos generados al cortar el ADN con las enzimas de restricción se separaron en base a su tamaño mediante electroforesis en un gel de agarosa. De este modo se comprobó que los tamaños obtenidos al digerir con *BamHI* (7050 pb + 2016 pb para *IRA* y 7086 pb + 2016 pb para *IRB*) eran los esperados, los cuales habían sido calculados con ayuda del programa VectorNTI. Lo mismo ocurrió con los fragmentos generados tras la digestión con *BstXI* (5694 bp + 2544 bp + 828 bp para *IRA* y 5730 bp + 2544 bp + 828 bp para *IRB*) (Figura 33).

La primera estrategia a seguir fue intentar incluir los plásmidos en el vector viral con un tamaño superior a las 5 kb: secuencia *stuffer* de 670 pb, promotor *AAT* asociado a una secuencia de potenciación (*enhancer*) de 665 pb, *PolyA insulator* de 426 pb, *IRA* 4146 pb o *IRB* 4182 pb, cola *poli-A* 426 pb. Las estrategias diferían entre sí en las enzimas de restricción con las que se cortaban vector e inserto para su posterior ligación. En los casos en los que hubo éxito en la ligación realizamos su transformación en bacterias *E. Coli* TOP10 quimiocompetentes y eletrocompetentes. Ninguna de las colonias obtenidas conservaba los *ITRs*.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, decidimos retirar la secuencia *stuffer* y la secuencia *enhancer* asociada al promotor. Es decir, reducir el promotor a únicamente la secuencia del promotor *AAT* (311 pb), sin secuencia de potenciación y minimizar el *poli-A* a 19 adeninas. Con todos estos

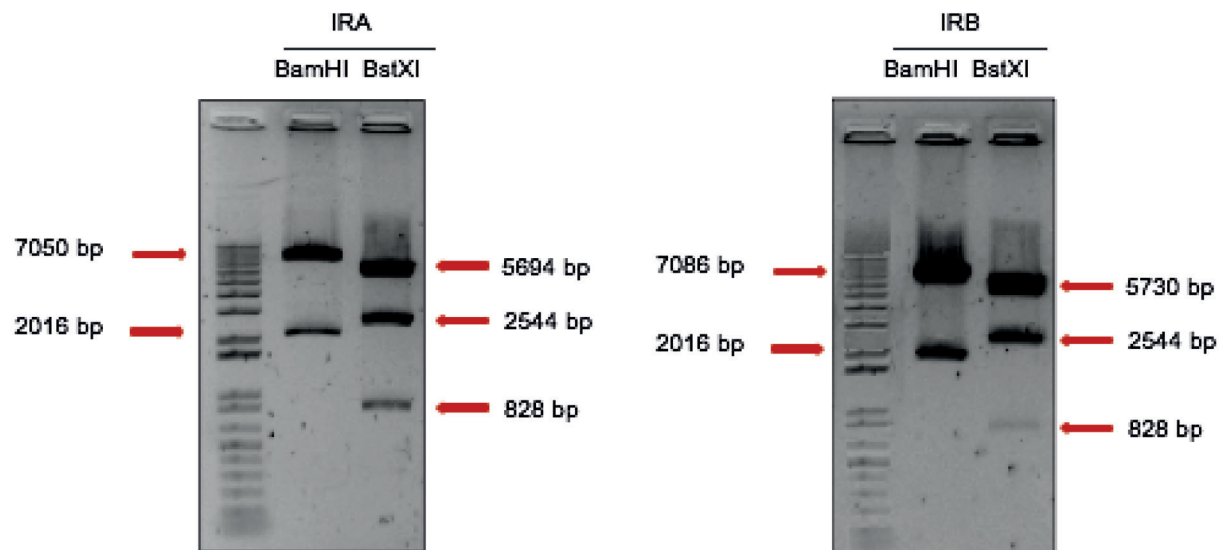


Figura 33. Comprobación de la identidad de los plásmidos pUC57-IRA y pUC57-IRB amplificados. Los fragmentos generados al cortar 10 µg de cada plásmido, pUC57-IRA o pUC57-IRB, con las enzimas de restricción BamHI (20 U/µL) o BstXI (10 U/µL) se separaron en base a su tamaño en un gel de agarosa. Se comprobó que los tamaños obtenidos al digerir con BamHI (IRA: 7050 pb + 2016 pb, IRB: 7086 pb + 2016 pb,) o BstXI (IRA: 5694 pb + 2544 pb + 828 pb, IRB: 5730 pb + 2544 pb + 828 pb) eran los esperados.

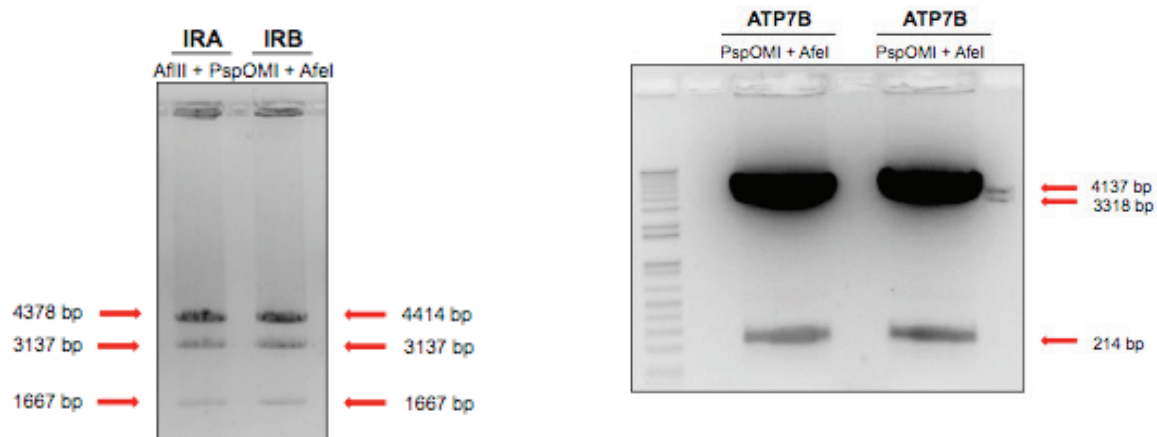


Figura 34. Digestión de los plásmidos pUC57-IRA y pUC57-IRB para retirar las secuencias stuffer y enhancer. Los fragmentos generados al cortar 5 µg de cada plásmido, pUC57-IRA o pUC57-IRB, con las enzimas de restricción PspOMI, AfeI y AflIII se separaron en base a su tamaño en un gel de agarosa. Se comprobó que los tamaños obtenidos, 4379 bp + 3137 bp + 1667 bp en el caso de IRA y 4414 bp + 3137 bp + 1667 bp en el caso de IRB, eran los esperados.

Figura 35. Digestión del plásmido AAV-AAT-ATP7B para retirar el inserto ATP7B. Los fragmentos generados al cortar 10µg del plásmido AAV-AAT-ATP7B, por duplicado, con las enzimas de restricción PspOMI y AfeI se separaron en base a su tamaño en un gel de agarosa. Se comprobó que los tamaños obtenidos al digerir con PspOMI y AfeI (4137 + 3318 + 214 pb) eran los esperados ya que las bandas pertenecientes a los tamaños de 4137 pb y 3318 pb se resuelven en el sexto pocillo.

cambios se reducía el tamaño del inserto aproximadamente en 1,5 kb. Para ello, cortamos 5 µg de cada plásmido pUC57-IRA y pUC57-IRB con AflII (20 U/µL) durante 2 h a 37 °C. A continuación tratamos con Klenow (5 U/µL) y dNTPs a 33 µM cada uno durante 15 min a 25 °C. La reacción se para en hielo y la inactivación completa de la enzima se realizó calentando la muestra a 65 °C durante 20 min. Como el resto de enzimas de restricción que vamos a utilizar necesitan tampones diferentes al de Klenow, que requiere NEB2, limpiamos la mezcla de reacción con una mezcla 1:10 de NaAc 3 M pH 5.2 y etanol absoluto. La digestión con PspOMI (20 U) y AfeI (10 U) se llevó a cabo a 37 °C durante toda la noche y en tampón *CutSmart*. 2 µL de cada producto de digestión se resolvieron mediante electroforesis en un gel de agarosa (Figura 34). Las bandas obtenidas coincidían con los tamaños de banda esperados: IRA 4378 pb + 3137 pb + 1667 pb, IRB: 4414 pb + 3137 pb + 1667 pb. Cortamos las bandas de interés 4378 bp IRA y 4414 bp IRB y extrajimos el ADN del gel de agarosa para purificarlo con el *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen). A continuación, resolvimos el producto purificado en un gel de electroforesis para cerciorarnos de que el corte se había producido correctamente y no había contaminaciones de otras bandas (Figura 37). Como se obtuvo una sola banda en cada carril, pudimos concluir que el aislamiento del inserto se había producido de forma correcta y procedimos a su purificación precipitándolo con una mezcla 1:10 de NaAc 3 M pH 5.2 y etanol absoluto.

En cuanto al vector, se utilizó el AAV-AAT-ATP7B (Murillo *et al.*, 2016) cedido por el laboratorio de la Dra. González-Asegui-nolaza, CIMA, Pamplona. Para eliminar el inserto previo, 10 µg del plásmido se cortaron con las enzimas de restricción AfeI y PspOMI durante 2 h a 37 °C. El produc-

to de la digestión se resolvió en un gel de agarosa en el cual el tamaño de las bandas obtenidas coincidió con el tamaño teórico: 4173 pb + 3318 pb + 214 pb. Las dos primeras bandas se resuelven sólo en uno de los pocillos debido a la cantidad excesiva de ADN (con menos ADN no se resolvía la banda de 214 pb, con lo cual no sabíamos si la digestión había funcionado o no) (Figura 35). Por tanto, purificamos la banda que contenía a las dos primeras con el *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) y la digerimos de nuevo con AfeI durante 2 h a 37 °C. Cortamos la banda de interés, 3318 bp, y la purificamos (Figura 36). Para defosforilar los extremos del vector y evitar que recircularizase, el vector se trató con fosfatasa alcalina (CIP), durante 1 h a 37 °C. Corrimos un gel de comprobación con 2 µL de ADN para asegurarnos que la habíamos purificado la banda correcta y no había restos de otras (Figura 37). Por último, el ADN del vector se purifica para la ligación precipitándolo con una mezcla 1:10 de NaAc 3 M pH 5.2 y etanol absoluto. Se obtuvo una concentración final de 200 ng/µL.

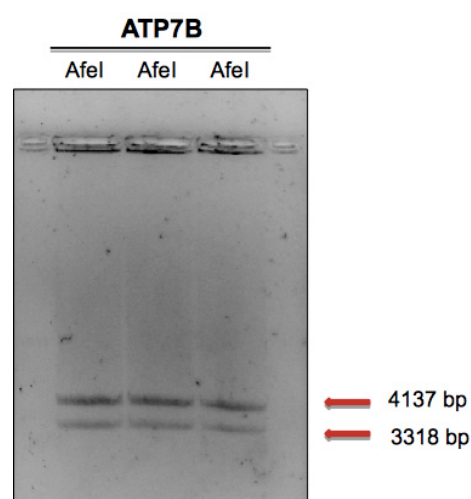


Figura 36. Digestión de la banda purificada del plásmido AAV-AAT-ATP7B con AfeI. El ADN purificado de la banda no resuelta del gel de la Figura 35 se digirió de nuevo con AfeI. Los fragmentos generados se separaron en base a su tamaño en un gel de agarosa. Se comprobó que los tamaños obtenidos (4137 pb + 3318 pb) eran los esperados. La digestión se realizó por triplicado.

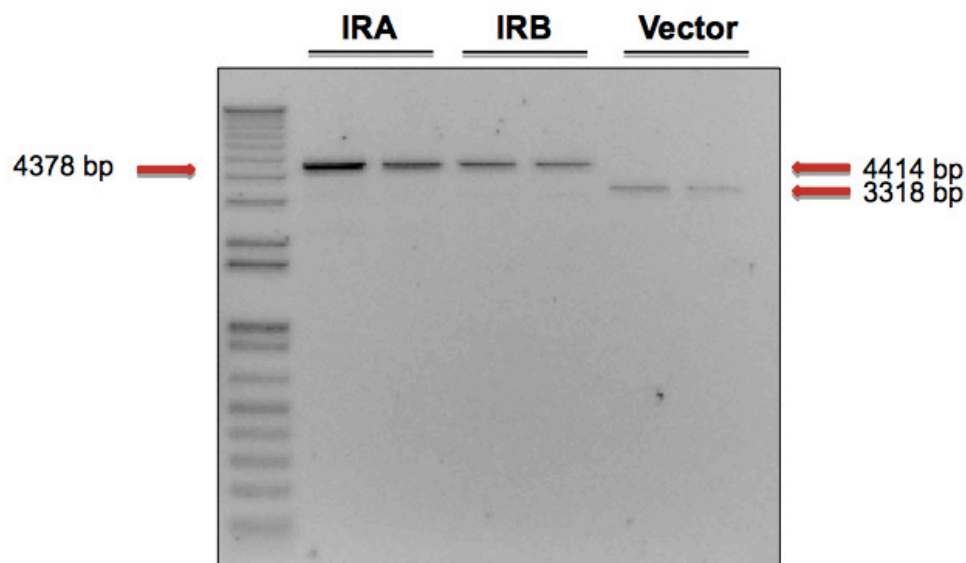


Figura 37. Comprobación del tamaño de las bandas purificadas para vector e insertos. 1 mL de cada banda purificada se corrió, por duplicado, en un gel de agarosa para comprobar su tamaño.

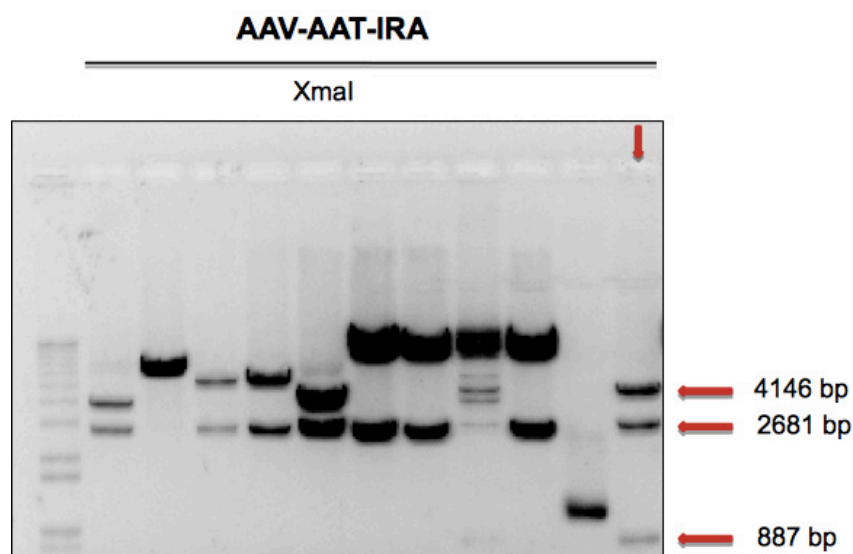


Figura 38. Comprobación de la presencia de los ITRs. El ADN procedente de los plásmidos AAV-AAT-IRA se digirió con XmaI para comprobar la presencia de los ITRs. Se observa una colonia positiva, señalada con una flecha roja. Se indican los tamaños de los fragmentos correspondientes a una digestión con XmaI del DNA de una colonia que conserva ambos ITRs: 4146 pb + 2681 pb + 887 pb. Los tamaños correspondientes a aquellas colonias que no conservan el ITR del extremo 5' presentan un tamaño de 4146 pb + 3579 pb; los que no conservan el 3' 6832pb + 887 pb. El plásmido se convierte en lineal cuando no conservan ninguno de los ITRs.

Aunque para realizar una ligación la cantidad de vector suele ser superior a la del inserto y, teniendo en cuenta que en nuestro caso inserto y vector tenían un tamaño muy similar, los porcentajes de ligación que realizamos fueron 1:4, 1:6 y 3:1. La ligación se llevó a cabo con la ligasa T4 (400 U/ μ L) a 16 °C durante toda la noche. La transformación de los productos de la ligación se realizó en bacterias TOP10 quimiocompetentes. Se realizaron *minipreps* para las 30 colonias obtenidas y

el ADN amplificado se digirió con XmaI (10 U/ μ L) durante 1 h a 37 °C para comprobar la presencia de los ITR. De las 30 colonias evaluadas con XmaI, sólo una colonia IRA conservaba los ITRs en 5' y 3', dando lugar a fragmentos de 4146 bp + 2681 bp + 887 bp (**Figura 38**). Para comprobar que inserto y vector habían ligado y descartar una posible autoligación, la posible colonia positiva se digirió con HincII (10 U/ μ L) durante 1 h a 37 °C. Puesto que sólo una de las secuencias de corte para HincII se encuentra en el vector y el producto obtenido no fue una única banda sino tres: 3819 bp + 3233 bp + 684 bp, podíamos concluir que inserto y vector habían ligado y lo habían hecho en el sentido correcto (**Figura 39**). Por tanto, habíamos generado el vector para producir los AAV-AAT-IRA.

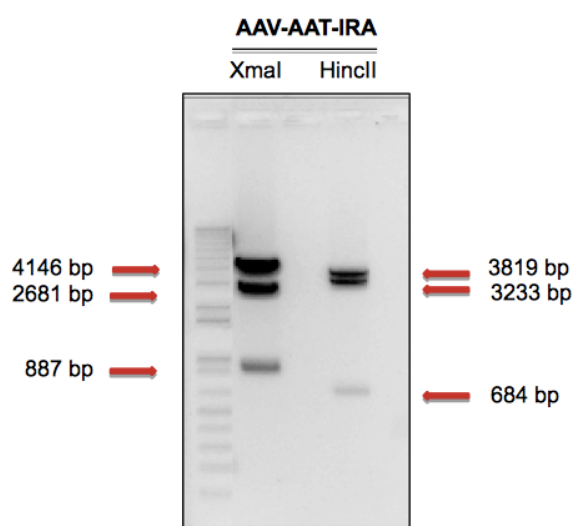


Figura 39. Verificación de la colonia AAV-AAT-IRA. El ADN procedente de los plásmidos AAV-AAT-IRA se digirió de nuevo con XmaI para comprobar la presencia de los ITRs. Una vez más, los tamaños de los fragmentos generados se corresponden con el de los esperados 4146 pb + 2681 pb + 887 pb. Los fragmentos de la digestión con HincII, 3819 pb + 3233 pb + 684 pb, demuestran que el sentido en el que se ha colocado el inserto en el vector es el correcto.

Debido a que con esta estrategia sólo habíamos conseguido generar AAV-AAT-IRA, decidimos eliminar la isoforma A del IR del vector que acabábamos de producir y sustituirlo por la isoforma B que obtendríamos de uno de los vectores sin

ITRs que habíamos generado siguiendo la estrategia anterior. Para ello amplificamos el ADN de AAV-AAT-IRA y cortamos 4 μ g de éste con EcoRI (20 U/ μ L) y PmlI (20 U/ μ L) durante 2 h a 37 °C. Las enzimas fueron inactivadas a 65 °C durante 20 min. Las bandas obtenidas en el gel de agarosa fueron las esperadas: 5444 pb + 2256 pb (**Figura 40**). Purificamos la banda de 5444 pb y, a continuación, tratamos el vector con CIP durante 1 h a 37 °C y purificamos de nuevo.

En cuanto al IRB, cortamos con EcoRI y PmlI durante 2 h a 37 °C. Las enzimas fueron inactivadas a 65 °C durante 20 min. Las bandas obtenidas en el gel de agarosa fueron las esperadas: 4390 pb + 2410 pb + 2292 pb + 120 pb (**Figura 41**). Purificamos la banda de 2292 pb, que contenía la isoforma B del IR (**Figura 42**). La ligación se llevó a cabo con la ligasa T4 a 16 °C durante toda la noche en proporción 1:5. La transformación de los productos de la ligación se realizó en bacterias TOP10 quimiocompetentes. Se realizaron *minipreps* para las 4 colonias obtenidas y el ADN amplificado se digirió con XmaI durante 1 h a 37 °C para comprobar la presencia de los ITR. De las 4 colonias evaluadas con XmaI, sólo una colonia IRB conservaba los ITRs en 5' y 3', dando lugar a fragmentos de 4182 bp + 2681 bp + 887 bp (**Figura 44**). Para comprobar que inserto y vector habían ligado y descartar una posible autoligación, la posible colonia positiva se digirió con HincII (10 U/ μ L) durante 1 h a 37 °C. Puesto que sólo una de las secuencias de corte para HincII se encuentra en el vector y el producto obtenido no fue una única banda sino tres: 3819 bp + 3233 bp + 684 bp, podíamos concluir que inserto y vector habían ligado y lo habían hecho en el sentido correcto (**Figura 23**). Por tanto, habíamos generado el vector viral para producir los AAV-AAT-IRB.

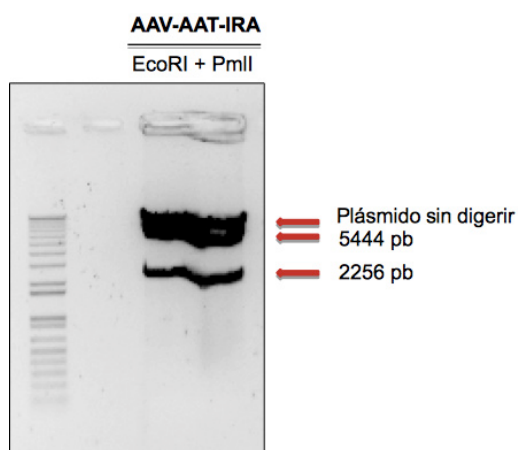


Figura 40. Digestión del plásmido AAV-AAT-IRA para retirar el inserto IRA. Los fragmentos generados al cortar 4 µg del plásmido AAV-AAT-IRA con las enzimas de restricción EcoRI y PmlI se separaron en base a su tamaño en un gel de agarosa. Se comprobó que los tamaños obtenidos al digerir con EcoRI y PmlI (5444 pb + 2256 pb) eran los esperados. Se continuó la agarosa hasta que las bandas del plásmido sin digerir y la correspondiente a 5444 pb se resolvieron lo suficiente para poder purificar ésta última.

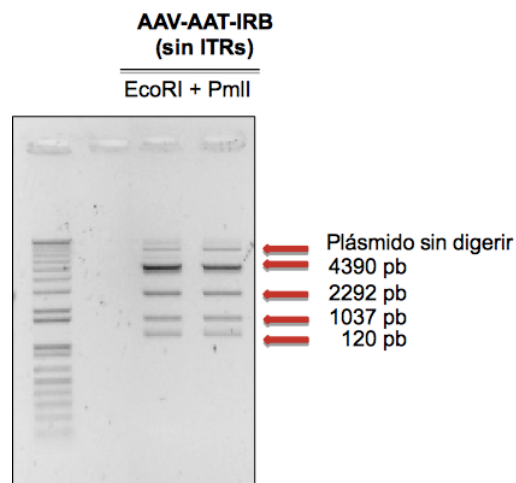


Figura 41. Digestión del plásmido AAV-AAT-IRB para rescatar el inserto IRB. Los fragmentos generados al cortar 4 µg del plásmido AAV-AAT-IRB sin ITRs con las enzimas de restricción EcoRI y PmlI se separaron en base a su tamaño en un gel de agarosa. Se comprobó que los tamaños obtenidos al digerir con EcoRI y PmlI (5444 pb + 2256 pb) eran los esperados. Se purificó la banda correspondiente al tamaño de 2292 pb.

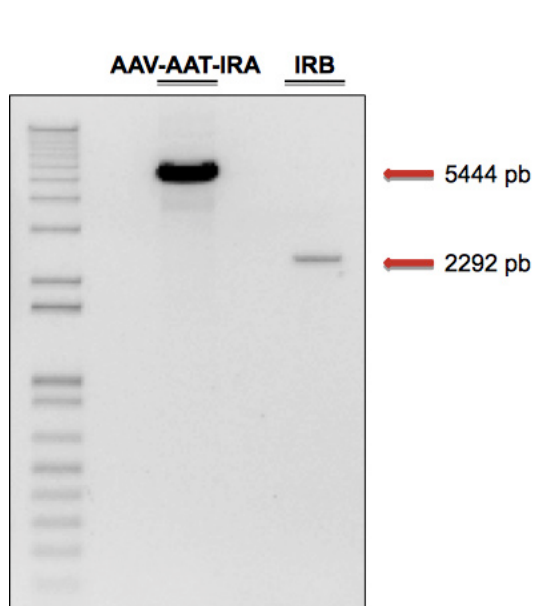


Figura 42. Comprobación del tamaño de las bandas purificadas para vector e insertos. 1 µL de cada banda purificada de vector, AAV-AAT-IRA, e inserto, IRB, se corrió en un gel de agarosa para comprobar su tamaño.

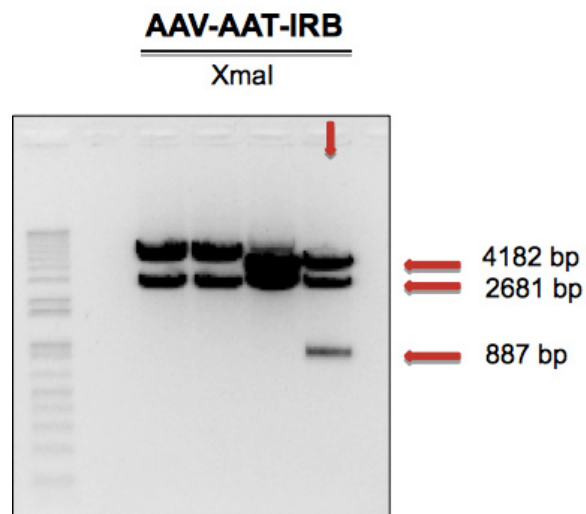


Figura 43. Comprobación de la presencia de los ITRs. El ADN procedente de los plásmidos AAV-AAT-IRB se digirió con XmaI para comprobar la presencia de los ITRs. Se observa una colonia positiva, señalada con una flecha roja. Se indican los tamaños de los fragmentos correspondientes a una digestión con XmaI del ADN de una colonia que conserva ambos ITRs: 4146 pb + 2681 pb + 887 pb. Los tamaños correspondientes a aquellas colonias que no conservan el ITR del extremo 5' presentan un tamaño de 4146 pb + 3579 pb; los que no conservan el 3' 6832pb + 887 pb. El plásmido se convierte en lineal cuando no conservan ninguno de los ITRs.

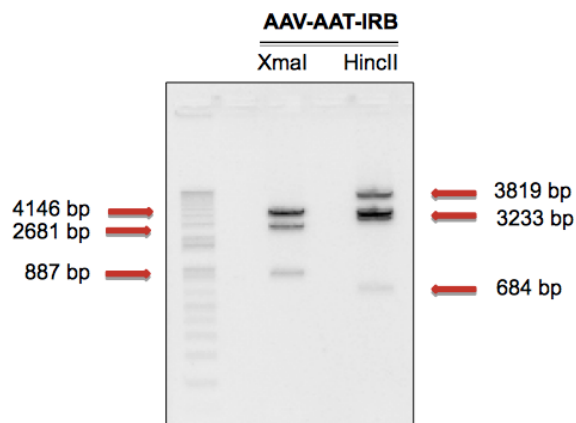


Figura 44. Verificación de la colonia AAV-AAT-IRB. El ADN procedente de los plásmidos AAV-AAT-IRB se digirió de nuevo con XmaI para comprobar la presencia de los ITRs. Una vez más, los tamaños de los fragmentos generados se corresponden con el de los esperados 4146 pb + 2681 pb + 887 pb. Los fragmentos de la digestión con HincII, 3819 pb + 3233 pb + 684 pb, demuestran que el sentido en el que se ha colocado el inserto en el vector es el correcto.

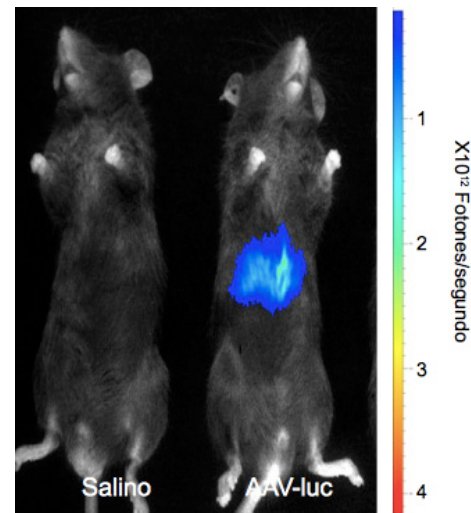


Figura 45. Imágenes in vivo de la actividad luciferasa después de la inyección del AAV-AAT-luc. Para el serotipo 8 el rango de expresión fue de entre 1 y 2×10^{12} γ/s. No se observa expresión en el ratón inyectado con salino. Se muestran imágenes 15 días después de la inyección.

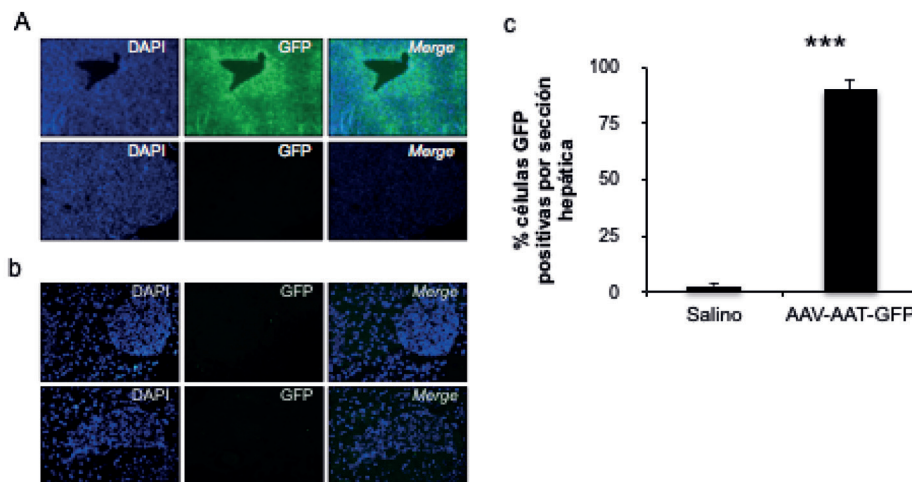


Figura 46. Eficiencia de transducción (GFP) en el hígado y páncreas de los ratones iLIRKO. Los ratones iLIRKO se inyectaron con 3×10^{10} pv/ratón de AAV-AAT-GFP. El hígado se procesó 15 días después de la inyección para el análisis de la expresión de GFP. a: Se muestran las inmunofluorescencias de secciones hepáticas (aumento 10X) y b: pancreáticas (aumento 20X) representativas teñidas con DAPI, GFP o la superposición de ambas, en ratones inyectados con AAV-AAT-GFP (paneles superiores) o con salino (paneles inferiores). c: Análisis morfométrico de la eficiencia de transducción del virus basado en el porcentaje de transducción de hepatocitos. Se representa el porcentaje de células GFP positivas por área. La significación estadística se representa como ratones inyectados con salino vs ratones inyectados con AAV-AAT-GFP *** ($p < 0.001$). c:

Una vez generados los plásmidos se llevó a cabo la producción viral de los AAV-AAT-IRA y AAV-AAT-IRB que se realizó según se especifica en el apartado 7 correspondiente de materiales y métodos.

El tropismo hepático se demostró mediante un ensayo luciferasa *in vivo*. El transgén de la luciferasa se utilizó para visualizar la distribución relativa del vector en los animales a tiempo real. El ensayo consistía en la cuantificación de la expresión de la enzima luciferasa en ratones inyectados con suero salino o con AAV-luc. Se examinaron imágenes dorsales de los animales (n=4 por grupo) 14 días después de la inyección (Figura 45). Se considera inicio de la expresión cuando la luz liberada por la actividad de la luciferasa se puede distinguir del fondo. Así, los resultados muestran que los animales inyectados con AAV-luc a una dosis 3×10^{10} partículas virales (pv) desarrollan actividad luciferasa 14 días después de la inyección, mientras que en los animales inyectados con suero salino no se observa expresión.

Para evaluar la eficacia de transducción *in vivo* se llevaron a cabo estudios de microscopía de fluorescencia en hígados de ratones inyectados con AAV-AAT-GFP. Los estudios de expresión se limitaron, por tanto, a tiempos de necropsia. Así, para determinar la dosis que íbamos a utilizar en los experimentos venideros, se llevaron a cabo estudios iniciales en ratones inyectados por la vena de la cola a diferentes dosis. Los hígados de los ratones tras 15 días de la inyección de AAV-AAT-GFP a una dosis de 3×10^{10} pv/ratón mostraron un alto porcentaje de hepatocitos transducidos, en torno al 90 %. Además, la transducción no afecta a otros tipos celulares ya que el páncreas de los ratones infectados con GFP, uno de los órganos propuestos como diana para el serotipo 8 de los AAVs, no muestra células GFP positivas (Figura 46).

LA EXPRESIÓN SELECTIVA DE LA ISOFORMA A DEL RECEPTOR DE INSULINA MEJORA LA HOMEOSTASIA GLUCÍDICA

Para estudiar si las isoformas del IR tienen un papel diferencial en la reversión del fenotipo diabético del ratón iLIRKO, diseñamos el esquema experimental mostrado en la Figura 47. Los AAVs se administraron 20 semanas después del nacimiento de los animales, cuando éstos ya habían desarrollado el fenotipo diabético según muestran los resultados de las curvas de intolerancia a glucosa y resistencia a insulina (Figura 30). La evolución de los ratones se examinó a los 2 y 4 meses tras la inyección de los AAVs. Los animales se sacrificaron 4 meses después de la inyección, es decir, a los 9 meses de edad. Los niveles de ADN genómico del *Insr* valorado por PCR cuantitativa se midieron en homogenados hepáticos de ratones Control, iLIRKO, iLIRKO IRA e iLIRKO IRB (Figura 48). Los resultados muestran niveles de delección similares en ratones iLIRKO, iLIRKO IRA e iLIRKO IRB, lo cual indica que la expresión de IR que se observa tras la administración de los AAV es debida a los vectores que éstos transportan y que contienen los transgenes de las isoformas humanas del receptor de insulina. Además, los animales mantienen la expresión de la isoforma que les ha sido administrada cuatro meses después de la correspondiente inyección (Figura 48). De no ser así, los ratones inyectados con la IRA expresarían IRB, puesto que ésta última es la isoforma prevalente en el hígado adulto. A continuación determinamos los niveles de receptor de insulina que se expresaban en el hígado tras la inyección de los AAVs, para descartar una posible sobreexpresión del receptor. La

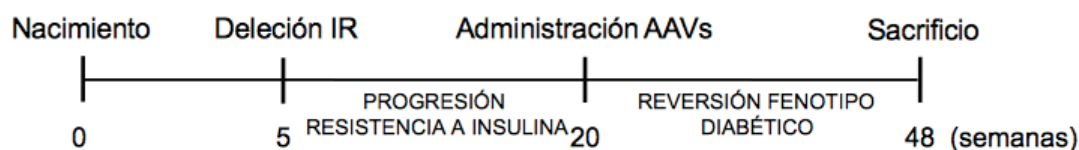


Figura 47. Esquema de administración de los AAVs.

Los ratones iLIRKO se inyectaron con 3×10^{10} pv/ratón del AAV correspondiente a las 20 semanas de edad, una vez alcanzado el fenotipo diabético. Los animales se sacrificaron 28 semanas después de la administración viral.

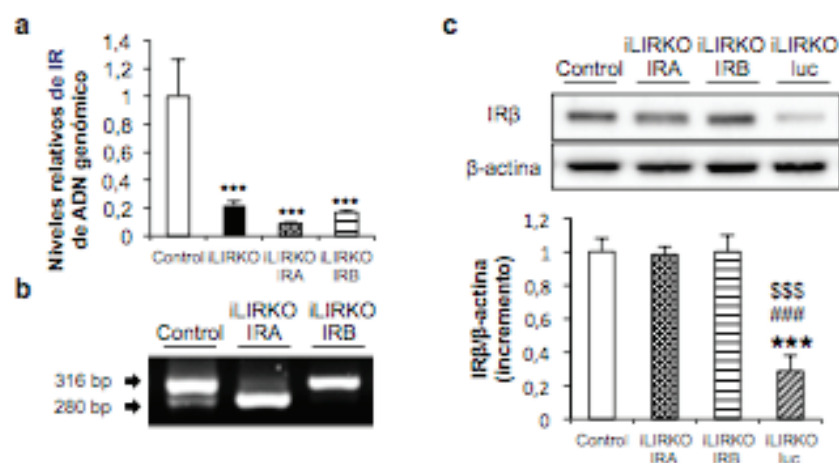


Figura 48. Los AAVs median la recuperación de la expresión de IRA o IRB en el hígado hasta niveles del Control.

a: El ADN genómico de ratones de 9 meses de edad Control o iLIRKO inyectados o no con AAV-AAT-IRA o AAV-AAT-IRB se aisló de los hígados y se analizó mediante qPCR para evaluar el grado de delección del IR a nivel genómico.

b: Evaluación de la expresión de las isoformas del receptor de insulina mediante RT-PCR del exón 11 en homogeneizados totales hepáticos de ratones de 9 meses de edad. Se analiza el *Insr* en los ratones Control y las *INSR* en iLIRKO IRA y iLIRKO IRB.

c: Evaluación de los niveles de IRβ en homogeneizados totales hepáticos por Western blot en ratones de 9 meses de edad Control, iLIRKO IRA, iLIRKO IRB y iLIRKO luc. Se utiliza la β-actina como control de carga. El histograma muestra la cuantificación de la intensidad de las bandas. (a,c) Los datos se presentan como media \pm SEM para cada grupo y la significación estadística como vs Control *** ($p < 0.001$); vs iLIRKO IRA ### ($p < 0.001$); vs iLIRKO IRB \$\$\$ ($p < 0.001$).

determinación se llevó a cabo por *Western blot* en homogeneizados hepáticos totales en ratones de 9 meses de edad. Así, 4 meses después de la administración de los AAV-AAT-IRA o AAV-AAT-IRB, la expresión de IRA o IRB respectivamente es similar a la observada en los animales Control. Sin embargo, no se observan cambios en los ratones iLIRKO inyectados con AAV-

AAT-luc, los cuales mantienen una mínima expresión del IR (**Figura 48**). Aunque la sobreexpresión del IRA se asocia con situaciones patológicas, no se observaron alteraciones en la morfología o estructura hepática tras 4 meses de la inyección viral ni en iLIRKO IRA, ni en iLIRKO IRB, ni en iLIRKO luc. Además, la tinción para Ki-67 no muestra diferencias significativas

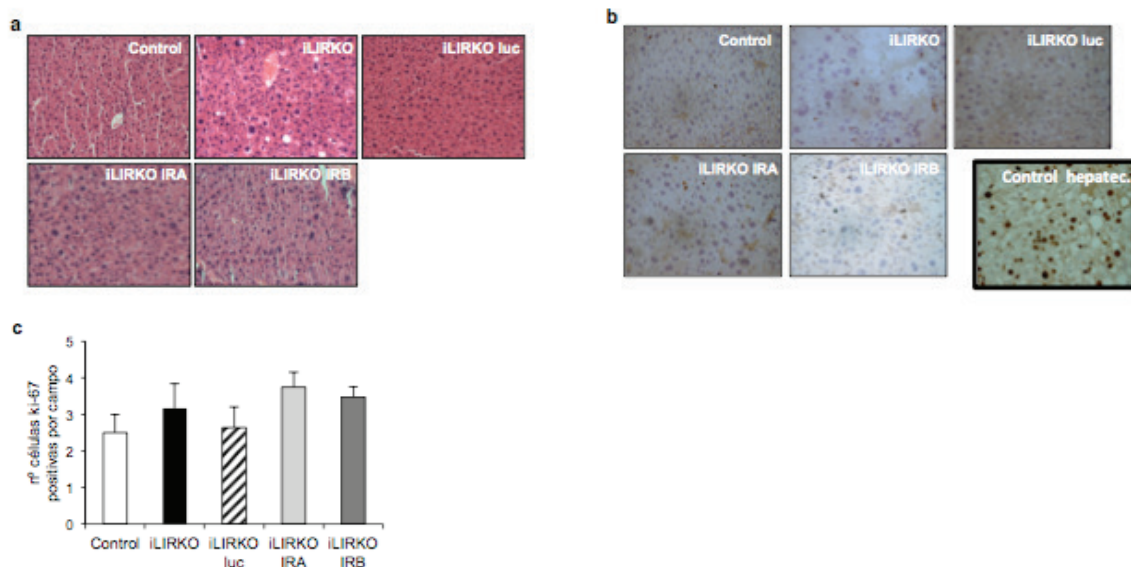


Figura 49. La expresión de la isoforma A del receptor de insulina en el hígado de los ratones iLIRKO no provoca daño hepático ni un incremento de la proliferación celular.

a: Tinción con hematoxilina/eosina representativa de secciones hepáticas de ratones Control, iLIRKO, iLIRKO luc (paneles superiores); iLIRKO IRA e iLIRKO IRB (paneles inferiores) de 9 meses de edad. Aumento 20X.

b: Tinción representativa para Ki-67 en secciones hepáticas de ratones Control, iLIRKO, iLIRKO luc (paneles superiores); iLIRKO IRA e iLIRKO IRB (paneles inferiores) de 9 meses de edad. Se muestra también un Control positivo para Ki-67 tras 48 h de la hepatectomía parcial (panel inferior recuadrado). Aumento 40X.

c: Cuantificación de la tinción para Ki-67 en secciones hepáticas. Los datos se representan como medias \pm SEM del n° de células positivas por campo.

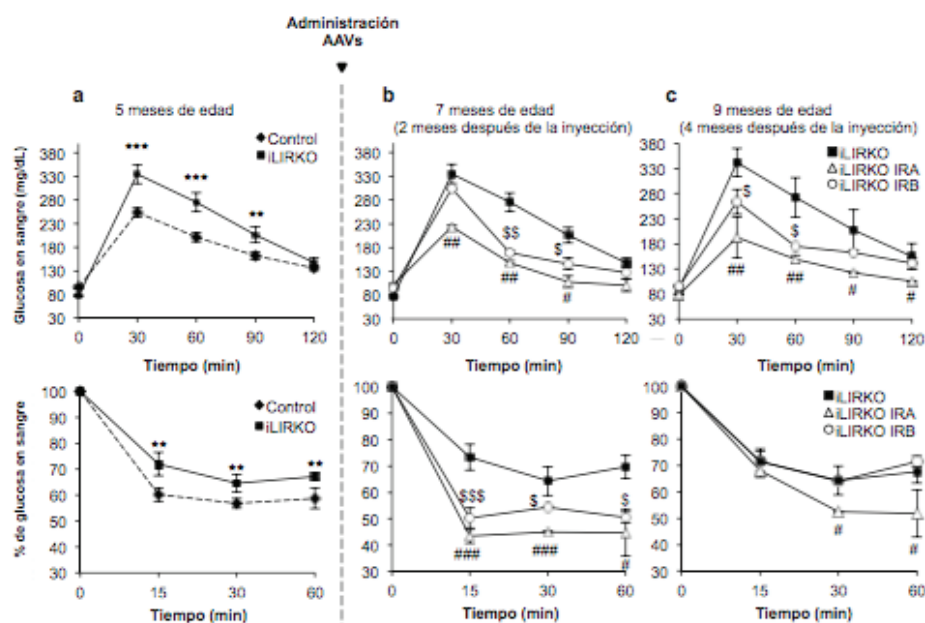


Figura 50. La expresión in vivo de la isoforma A del receptor de insulina en hepatocitos revierte la resistencia a insulina y la tolerancia a glucosa a largo plazo.

a: Test de tolerancia a glucosa intraperitoneal (panel superior) y de tolerancia a insulina (panel inferior) en ratones Control e iLIRKO de 5 meses de edad (n=10 animales por grupo). (b,c) A esos mismos 10 ratones iLIRKO se les administran AAV-AAT-IRA o AAV-AAT-IRB (n=5 por isoforma) a los 5 meses de edad. Test de tolerancia a glucosa (panel superior) e insulina intraperitoneal (panel inferior) 2 y 4 meses tras la inyección. Los datos se presentan como media \pm SEM para cada grupo y la significación estadística se representa como Control vs iLIRKO * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001); iLIRKO vs iLIRKO IRA # (p<0.05), ## (p<0.01), ### (p<0.001); iLIRKO vs iLIRKO IRB \$ (p<0.05), \$\$ (p<0.01), \$\$\$ (p<0.001).

entre los distintos grupos, lo que indica que no hay una proliferación anómala de las células. El rango de proliferación se mantiene bajo en todos los casos (Figura 49). Así, nuestros datos indican que la expresión a largo plazo mediada por AAVs de IRA o IRB parece una estrategia no dañina y segura para el hígado.

Teniendo en cuenta que la expresión selectiva de la isoforma A del receptor de insulina aumenta la captación de glucosa en hepatocitos neonatales, quisimos comprobar si la expresión selectiva de una u otra isoforma en ratones iLIRKO modifica la homeostasia glucídica. En primer lugar, realizamos test de tolerancia a glucosa e insulina a los ratones iLIRKO de 5 meses que iban a ser inyectados con AAV-AAT-IRA o AAV-AAT-IRB (4 ratones con cada vector) (Figura 50a). De este modo se puede observar específicamente la evolución de los ratones inyectados. Así, los test de tolerancia a glucosa e insulina que se muestran son a 2 y 4 meses tras la administración viral, es decir, 7 y 9 meses de edad respectivamente (Figura 50b,c). Tanto la intolerancia a glucosa como la resistencia a insulina mejora con la expresión de una u otra isoforma del IR. Sin embargo, 2 meses después de la inyección, IRA es

capaz de restablecer los niveles de glucosa en sangre similares a los observados en animales Control. Además, estas diferencias entre iLIRKO IRA e iLIRKO IRB se mantienen 4 meses después de la administración de los AAVs. Los resultados confirman que IRA parece ser más efectiva que la isoforma B a la hora de restablecer la homeostasia glucídica en los ratones iLIRKO.

Quisimos comprobar si el mismo mecanismo que rige en los hepatocitos neonatales para aumentar la captación de glucosa, asociación del GLUT2 con el IR, se confirmaba en nuestro modelo *in vivo*. Para ello realizamos ensayos de inmunoprecipitación con anticuerpos anti-GLUT2 con posterior *Western blot* frente a la subunidad β del IR en homogeneizados hepáticos totales de ratones de 9 meses de edad. Los resultados obtenidos muestran una mayor asociación estadísticamente significativa entre IRA y GLUT2 que la observada entre IRB y GLUT2 en los correspondientes ratones iLIRKO IRA o iLIRKO IRB. Se muestra el histograma en el que se representa la cuantificación de la intensidad de las bandas correspondientes (Figura 51).



Figura 51. La isoforma A del receptor de insulina se asocia con el GLUT2 *in vivo*. *Western blot* (WB) representativo de IR β y GLUT2 en homogeneizados totales hepáticos en ratones de 9 meses de edad iLIRKO IRA e iLIRKO IRB sometidos, previamente, a inmunoprecipitación (IP) con GLUT2. El histograma muestra la cuantificación de la intensidad de las bandas. Los datos se presentan como media \pm SEM para cada grupo (n=4 por isoforma) y la significación estadística como iLIRKO IRA vs iLIRKO IRB δ (p< 0.05).

LA EXPRESIÓN DE IRA EN EL HÍGADO INDUCE UNA DISMINUCIÓN EN LA MASA DE CÉLULA β

La mejora de la homeostasia glucídica debida a la expresión de IRA en los ratones iLIRKO trae como consecuencia directa la disminución de los niveles de insulina en plasma y la regresión de la masa de célula β pancreática. En concreto, los niveles de insulina en plasma en iLIRKO IRA disminuyen de forma significativa 2 meses después de la administración viral (7 meses de edad) en comparación con los ratones iLIRKO a la misma edad. Sin embargo, los ratones iLIRKO IRB mantienen elevados niveles de insulina en plasma, similares a los de los ratones iLIRKO sin inyectar. Ambos resultados se mantienen a los 4 meses (Figura 52).

La hiperinsulinemia observada en los ratones iLIRKO se correlaciona con un

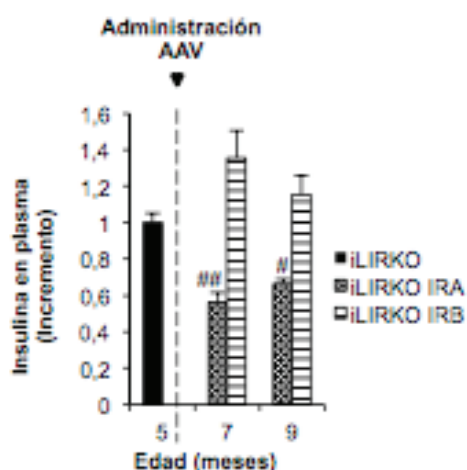


Figura 52. La expresión de la isoforma A del receptor de insulina en el hígado de los ratones iLIRKO disminuye la hiperinsulinemia.

Niveles de insulina en plasma en animales de 9 meses de edad ayunados durante 16 horas. Los datos se presentan como media \pm SEM para cada grupo (n=5) y la significación estadística como iLIRKO vs iLIRKO IRA # (p< 0.05), ## (p< 0.01).

aumento significativo de la masa de célula β . Este incremento significativo es debido exclusivamente a un aumento en el número de islotes en comparación con los ratones Control, ya que no se observa ningún cambio en la distribución de los islotes por tamaño. En el caso de los ratones iLIRKO IRA, los resultados muestran una regresión de la hiperplasia de la masa de célula hasta valores similares a los de los ratones Control. En este caso, la disminución en la masa de célula β se debe a un menor número de islotes, similares a los del Control. iLIRKO IRA no muestra cambios significativos en la distribución de islotes por tamaños en comparación con los ratones Control o iLIRKO. Los ratones inyectados con la isoforma B mantienen el incremento de la masa de célula β en niveles similares a los de iLIRKO. Sin embargo, el número de islotes está significativamente disminuido en comparación con iLIRKO. Por tanto, el mantenimiento de la hiperplasia sólo puede explicarse por el cambio en el tamaño de los islotes, favorable a los de tamaño mediano (1000-10000 μm^2), en los ratones iLIRKO IRB. Los resultados mostrados anteriormente aportan claras evidencias de que la expresión de IRA o IRB en el hígado es un hecho crucial para el control de la homeostasia glucídica y, por tanto, de la masa de célula β (Figura 53).

Para caracterizar más a fondo los mecanismos mediante los cuales se produce la regresión de la hiperplasia de la célula β pancreática en los ratones iLIRKO IRA, estudiamos el marcador de proliferación celular PCNA en cortes de páncreas mediante cotinciones con insulina (para marcar los islotes), DAPI (ya que el PCNA sólo es indicativo de proliferación cuando se encuentra en el núcleo celular) y PCNA. Hay un aumento significativo en la expresión de PCNA en núcleo en los ratones iLIRKO en comparación con ratones Control e iLIRKO IRA. Sin embargo, en los

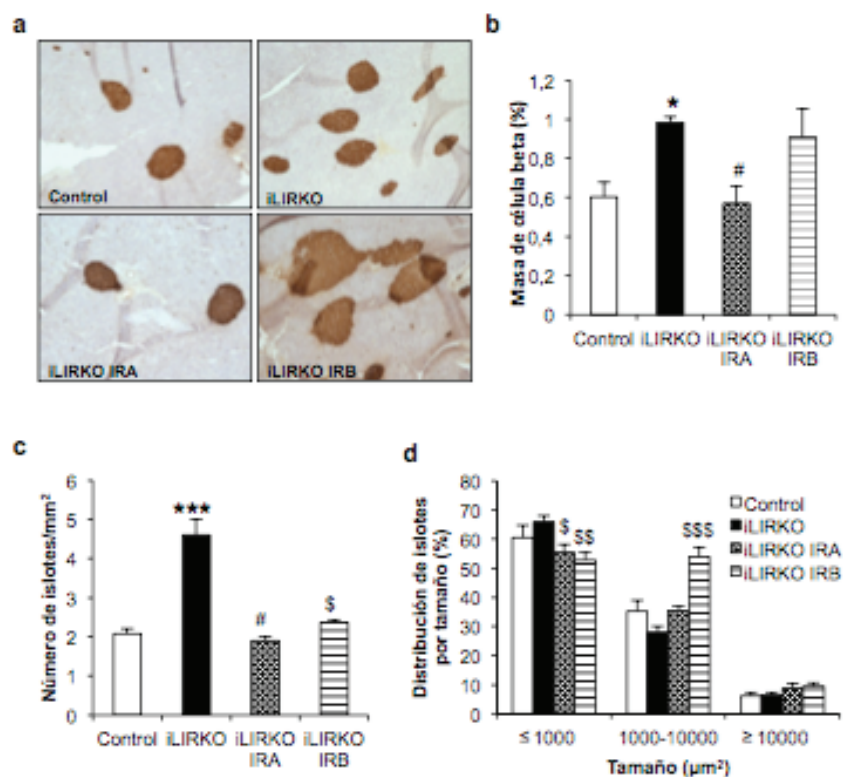


Figura 53. La expresión in vivo de la isoforma A del receptor de insulina en el hígado de los ratones iLIRKO revierte la hiperplasia de célula β .

a: Tinción representativa con insulina en secciones pancreáticas de ratones Control, iLIRKO (paneles superiores); iLIRKO IRA e iLIRKO IRB (paneles inferiores) de 9 meses de edad. Aumento 10X.

b: Masa de célula β

c: Densidad de islotes.

d: Distribución de islotes por tamaño. Los datos se presentan como media \pm SEM para cada grupo (n=5) y la significación estadística como Control vs iLIRKO * (p< 0.05), *** (p<0.001); iLIRKO vs iLIRKO IRA # (p< 0.05); iLIRKO IRA vs iLIRKO IRB \$ (p< 0.05), \$\$ (p< 0.01), \$\$\$ (p< 0.001).

ratones iLIRKO IRB observamos ausencia total de células β positivas para PCNA con localización nuclear, lo que sugiere que el incremento de masa de célula β observado en estos ratones puede estar relacionado con la presencia de células β hipertróficas (Figura 54).

Una de las moléculas que ha sido propuesta en trabajos previos del grupo como mediadora en el eje hígado-páncreas es el IGF-I. Por tanto, analizamos por *Western blot* el IGF-I presente en los homogeneizados hepáticos de ratones Control, iLIRKO, iLIRKO IRA e iLIRKO IRB de 9 meses de edad. Los resultados muestran un incremento significativo en los ratones iLIRKO en comparación con el Control. La expresi-

ón hepática de la isoforma A consigue revertir ese aumento, disminuyendo los niveles hasta los del Control. Sin embargo la isoforma B no es capaz de revertirlos (Figura 55). Estos resultados sugieren una correlación entre la intolerancia a la glucosa, aumento de masa de célula β y sobreexpresión de IGF-I. Por otro lado, teniendo en cuenta que el IGF-I es uno de los principales factores implicados en la proliferación celular, que se sintetiza fundamentalmente en el hígado y que, además, se une con alta afinidad al IRA, una disminución de éste en el hígado es favorable para evitar cualquier tipo de disfunción hepática generada por la formación de un bucle autocrino.

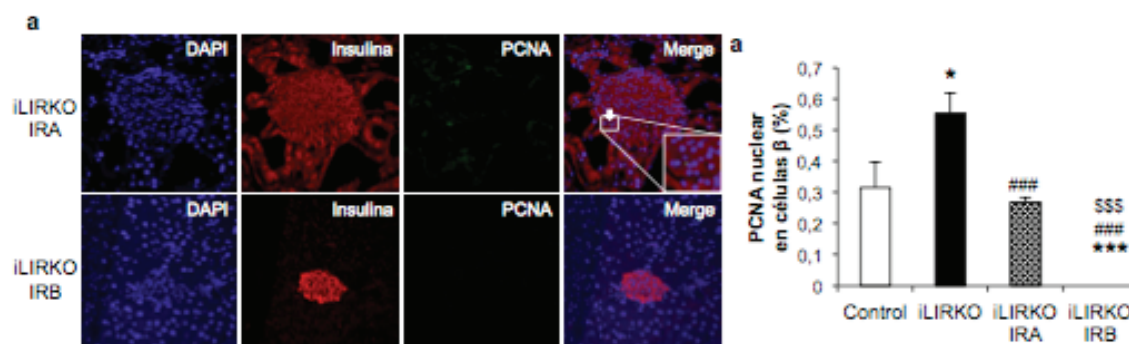


Figura 54. La expresión in vivo de la isoforma A del receptor de insulina en el hígado de los ratones iLIRKO revierte la hiperplasia de célula β porque disminuye la proliferación.
a: Tinción representativa con insulina (rojo), PCNA (verde) y DAPI (azul) en secciones pancreáticas de ratones iLIRKO IRA (panel superior) e iLIRKO IRB (panel inferior) de 9 meses de edad. Aumento 40X. b: Cuantificación de las células β positivas que presentan localización nuclear para PCNA. Los datos se presentan como % respecto al total \pm SEM para cada grupo (n=5) y la significación estadística como Control vs iLIRKO * (p < 0.05) *** (p < 0.001); iLIRKO vs iLIRKO IRA ### (p < 0.001); iLIRKO IRA vs iLIRKO IRB \$\$\$ (p < 0.001).

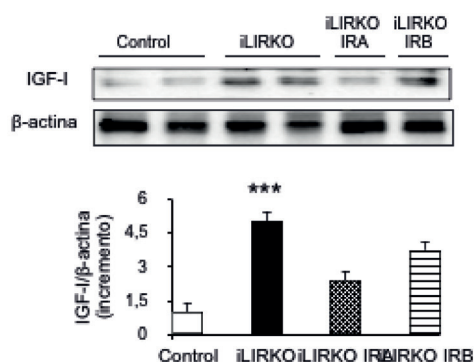


Figura 55. La expresión de la isoforma A del receptor de insulina disminuye la expresión hepática de IGF-I.
a: Western blot representativo de IGF-I en homogeneizados totales hepáticos en ratones de 9 meses de edad Control, iLIRKO, iLIRKO IRA e iLIRKO IRB. Se utiliza la β -actina como control de carga. El histograma muestra la cuantificación de la intensidad de las bandas. (a,c) Los datos se presentan como media \pm SEM para cada grupo (n=5) y la significación estadística como vs Control *** (p < 0.001).

EFFECTOS DE LA EXPRESIÓN DE IRA EN EL HÍGADO EN EL METABOLISMO DEL GLUCÓGENO

Puesto que una de las principales contribuciones a la fisiopatología de la diabetes tipo 2 es la disminución de las reservas

de glucosa, es de gran relevancia conocer el efecto fisiológico de las isoformas en la regulación del metabolismo del glucógeno en un contexto *in vivo*, concretamente en los animales iLIRKO, iLIRKO IRA e iLIRKO IRB. Tras 24 h de ayuno seguidas de 1 h de realimentación, los ratones iLIRKO muestran un ligero, aunque no significativo, descenso en el contenido en glucógeno en comparación con los ratones Control. Sin embargo, los ratones iLIRKO IRA muestran aumentado el contenido en glucógeno de forma significativa en comparación con los ratones Control o iLIRKO, mientras que los ratones iLIRKO IRB mostraron valores similares al Control. A continuación se llevó a cabo el estudio de las principales proteínas implicadas en la ruta de la síntesis de glucógeno en ratones Control, iLIRKO, iLIRKO IRA e iLIRKO IRB en las condiciones anteriores de ayuno y realimentación. Así, los niveles totales de GYS2 están significativamente disminuidos en iLIRKO IRA en comparación con iLIRKO IRB. Sin embargo, la relación pGYS2/GYS2 fue similar en los dos grupos, lo que sugiere una fuerte regulación

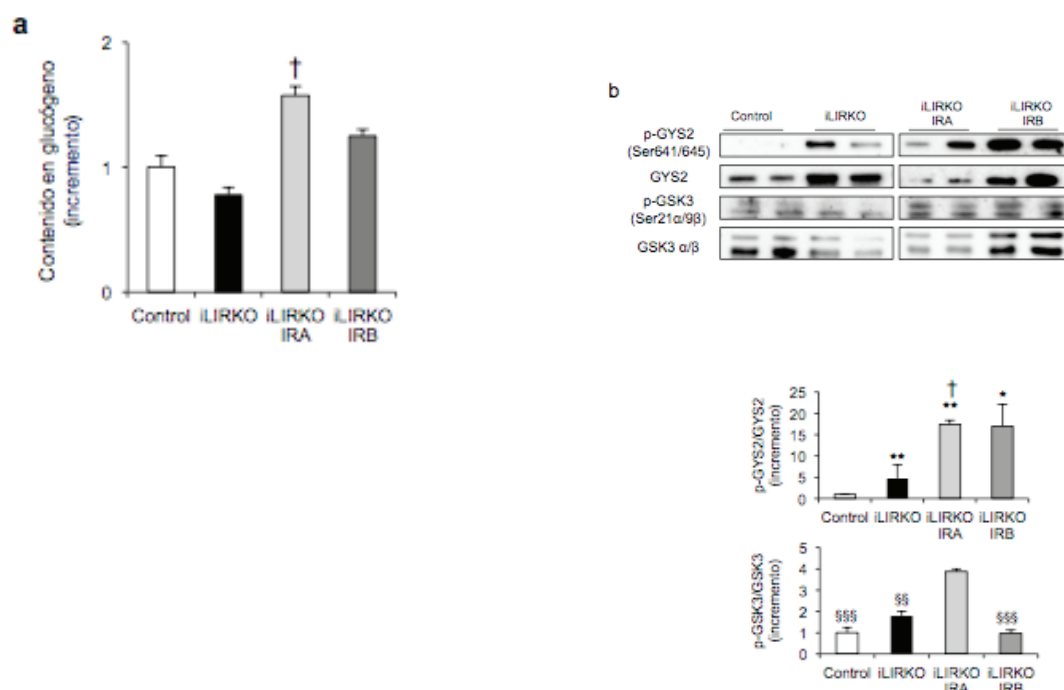


Figura 56. Regulación diferencial del metabolismo del glucógeno por las isoformas del receptor de insulina en los ratones iLIRKO.

La regulación del metabolismo del glucógeno se estudió en ratones Control, iLIRKO, iLIRKO IRA e iLIRKO IRB tras 24 h de ayuno seguidas de 1 h de realimentación.

a: Contenido en glucógeno.

b: *Western blot* representativo con los anticuerpos indicados en la figura. GYS2 y GSK3 α/β se muestran como control de carga. Los histogramas muestran la cuantificación de la intensidad de las bandas. (a,b) Los datos se presentan como media \pm SEM para cada grupo (n=5 por grupo) y la significación estadística como * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) vs Control; [†] ($p < 0.05$) vs iLIRKO; §§ ($p < 0.01$), §§§ ($p < 0.001$) vs iLIRKO IRA.

covalente de esta enzima en los animales iLIRKO IRA. Además, estos animales presentan unos niveles de fosforilación de GSK3 α/β significativamente aumentados en comparación con los ratones Control, iLIRKO e iLIRKO IRB (Figura 56).

Para comprobar que la falta de efecto o el efecto disminuido de la isoforma B en comparación con la A no se debía en ningún caso a la ausencia de señalización por parte de éste, se comprobó la activación del IRB y su cascada de señalización con insulina en los ratones iLIRKO IRB (Figura 57).

ESTUDIO DEL PAPEL DIFERENCIAL DE LAS ISOFORMAS DEL RECEPTOR DE INSULINA *in vitro* EN RELACIÓN AL METABOLISMO DEL GLUCÓGENO

El siguiente paso fue estudiar en profundidad qué efectos se producen en el metabolismo del glucógeno la variación del patrón de expresión de las isoformas del receptor de insulina. Para ello trabajamos con cuatro líneas celulares de hepatocitos neonatales: IRloxP, IRKO, IRA e IRB. En primer lugar, se comprobó la delección del exón 4 del *Insr* por RT-PCR en mRNA procedente de las células IRloxP e IRKO, así como la ausencia/presencia del exón 11 mediante RT-PCR en los hepatocitos IRA e IRB respectivamente (Figura 58). Además,

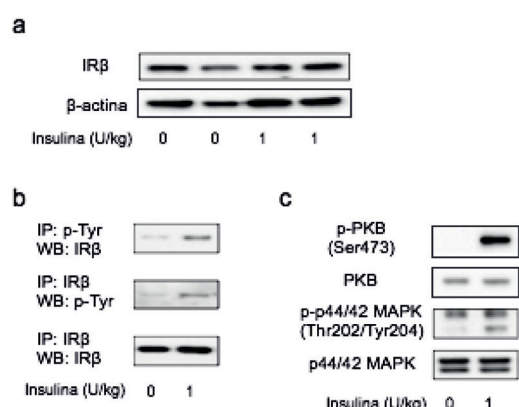


Figura 57. La insulina activa al receptor de insulina y su cascada de señalización en ratones iLIRKO IRB. a: Western blot (WB) representativo de la subunidad IR β en homogeneizados totales hepáticos de ratones de 9 meses de edad iLIRKO IRB. b: WB representativo de la activación de IR por insulina en homogeneizados totales hepáticos de ratones de 9 meses de edad iLIRKO IRB inyectados con salino o con insulina (1U/kg) (n=4 por grupo). Las muestras se sometieron a inmunoprecipitación con anticuerpos frente p-Tyr o IR β y WB frente IR β o p-Tyr respectivamente. c: WB representativo de la activación de la cascada de señalización de insulina en homogeneizados totales hepáticos de ratones de 9 meses de edad iLIRKO IRB inyectados con salino o con insulina (1U/kg) (n=4 por grupo).

confirmamos la ausencia de expresión del IR en las células IRKO mediante *Western blot* (Figura 59).

A continuación estudiamos las principales proteínas implicadas en el metabolismo del glucógeno de la cascada de señalización de la insulina en condiciones de cultivo, es decir, con medio con 25 mM de glucosa y suero, para observar cualquier cambio en el patrón de expresión dependiente, únicamente, de la presencia o ausencia del IR o de la isoforma del IR expresada. Se observa un aumento significativo en la expresión de IGF-IR en los hepatocitos IRKO o IRB en comparación con los IRloxP o IRA. Además, la expresión de IGF-IR está significativamente disminuida en las células IRKO en comparación con las IRloxP, aunque no se observan cambios significativos en los hepatocitos IRA ni IRB. Más directamente relacionado con



Figura 58. Caracterización de las líneas celulares de hepatocitos. Se aisló el ARN total para ser analizado por RT-PCR. a: Se evaluó la delección del exón 4 de Insr en hepatocitos IRloxP e IRKO. b: Se determinó la presencia/ausencia del exón 11 de INSR en hepatocitos IRA e IRB.

el metabolismo de la glucosa, la expresión de la GCK se encuentra significativamente aumentada en los hepatocitos IRA y significativamente disminuida en los IRB en comparación con los IRloxP. La expresión de la GYS2 en hepatocitos IRB es significativamente mayor que en IRloxP o IRA. Sin embargo, la expresión de p70S6K está significativamente incrementada en IRKO, IRA e IRB en comparación con las células IRloxP. La expresión de IRS1 en las células IRKO se encuentra significativamente disminuida en comparación con las IRloxP; sin embargo, en IRB se encuentra significativamente aumentado en comparación con cualquiera de las otras tres líneas celulares estudiadas. Lo contrario ocurre con el IRS2 en las células IRB. Por último, no se encontraron diferencias significativas entre las cuatro líneas celulares estudiadas en los niveles de IGF-II, PKB, p44/42 MAPK, GSK3 α/β , GLUT1 o GLUT2 (Figura 59).

Para continuar con el estudio del papel diferencial de las isoformas del IR en el

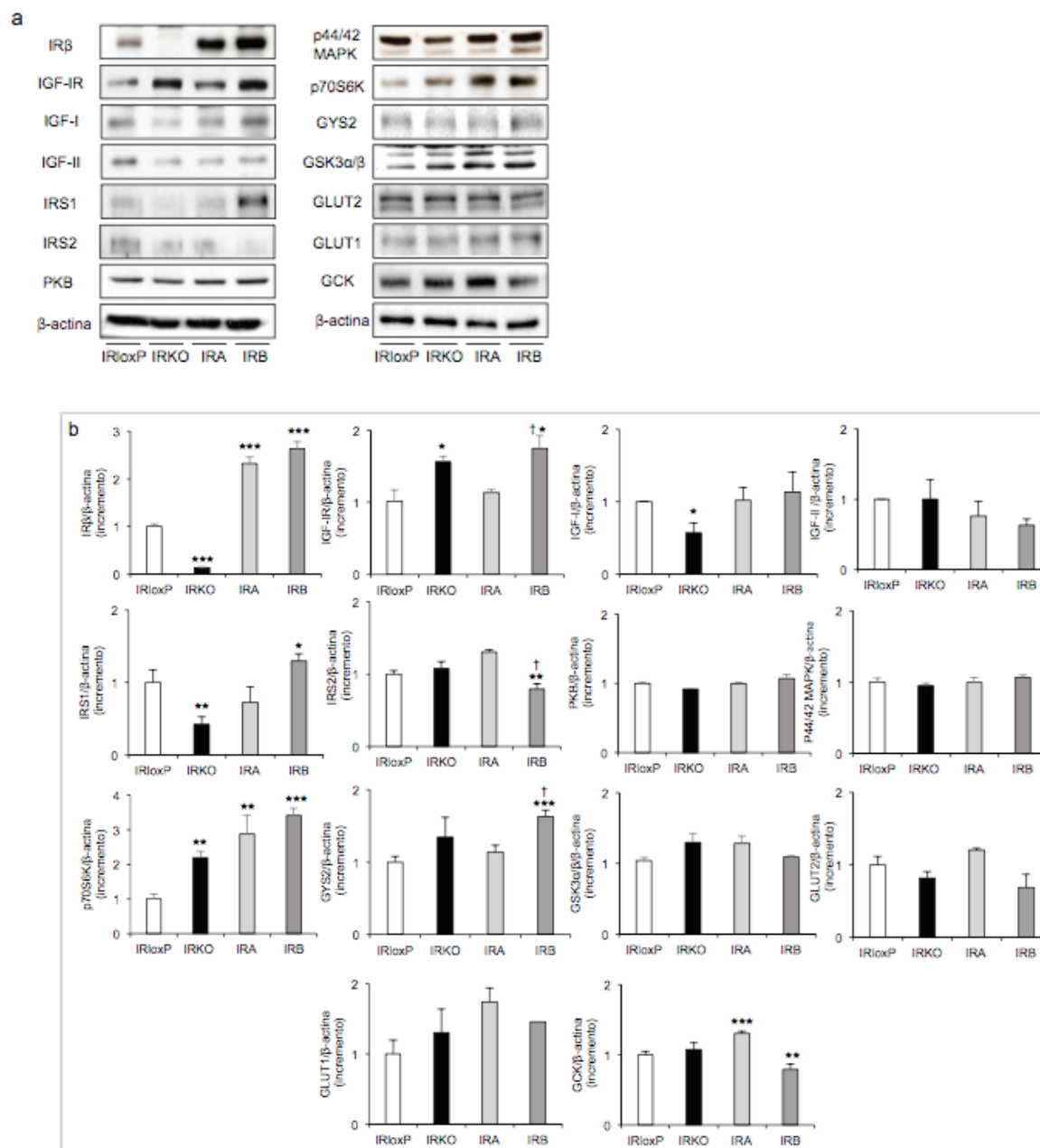


Figura 59. Caracterización de las principales proteínas de la cascada de señalización de insulina en las líneas celulares de hepatocitos.

a: *Western blot* representativo en hepatocitos IRloxP, IRKO, IRA e IRB. **b:** Los histogramas muestran la cuantificación de la intensidad de las bandas. Los datos se presentan como media \pm SEM para cada grupo ($n=4$) y la significación estadística como vs IRloxP * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$); vs IRA † ($p < 0.05$).

metabolismo del glucógeno, estudiamos su respuesta a diferentes dosis de insulina. Las cuatro líneas de hepatocitos se privaron de suero durante 5 h y, durante este tiempo, se mantuvieron en medio con 5.5 mM de glucosa. A continuación se estimularon con dosis crecientes de

insulina (0,1; 1; 10 nM) durante 5 min. Las dos principales cascadas de señalización activadas por insulina descritas hasta la fecha son la vía de las MAPKs y PKB. En concreto, después de ser estimuladas con insulina 10 nM, en las células IRloxP, PKB se observó un incremento significativo en

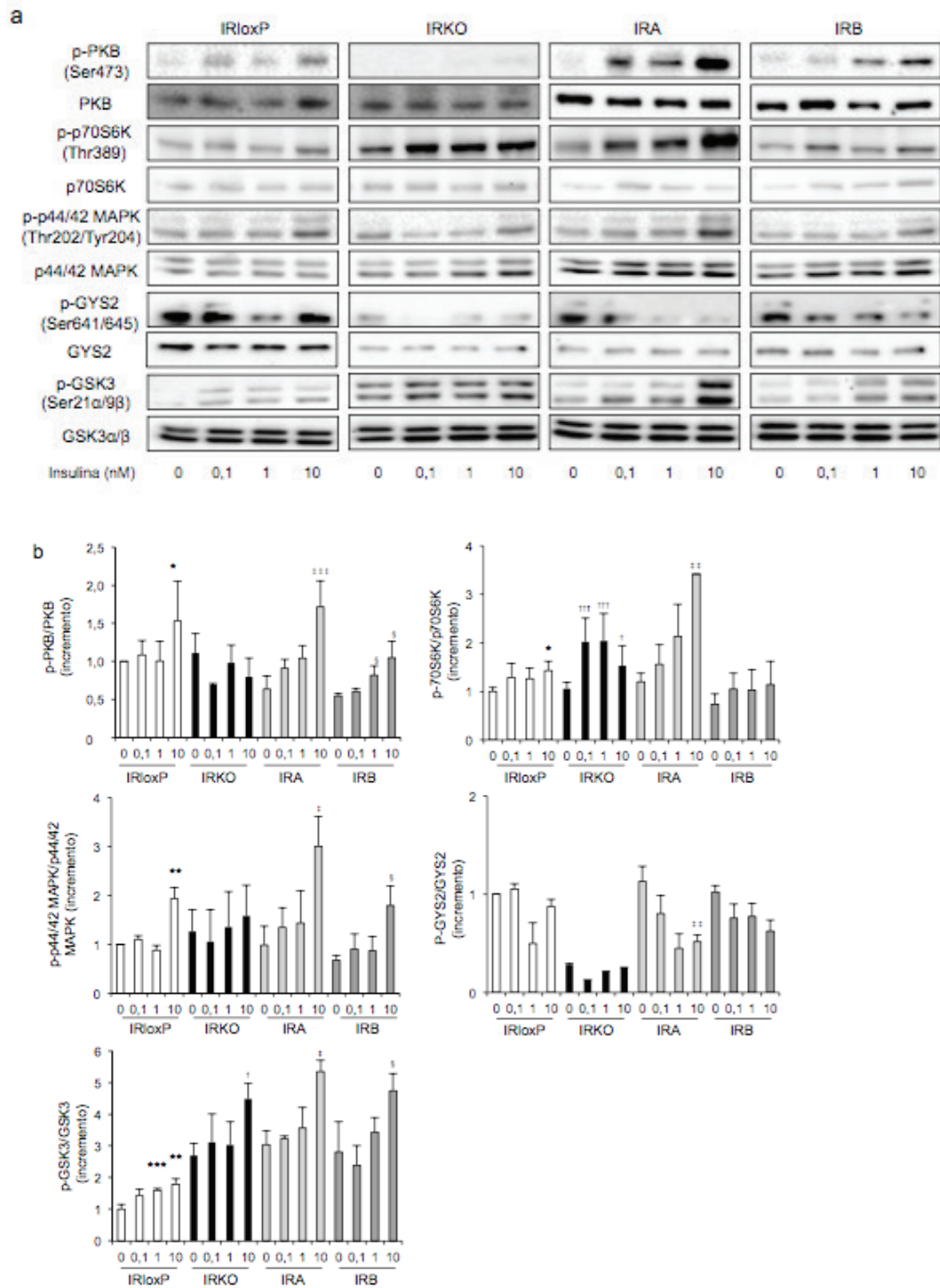


Figura 60. La cascada de señalización de la insulina está favorecida en hepatocitos IRA vs IRB.

a: Respuesta a diferentes dosis de insulina (0-10 nM/L) en la fosforilación de PKB, p70S6K, p44/42 MAPK, GYS2 y GSK3α/β en hepatocitos IRloxP, IRKO, IRA and IRB. Las células se privaron de suero durante 5 horas and, a continuación, se estimularon con insulina (0-10 nM/L) durante 5 minutos. Se muestran los *Western blot* representativos de cinco experimentos independientes (n=6). Como control de carga se utilizaron PKB, p70S6K, p44/42 MAPK, GYS2 and GSK3α/β totales.

b: Los histogramas muestran la cuantificación de la intensidad de las bandas. Los datos se presentan como media ± SEM para cada grupo (n=6) y la significación estadística como * (p < 0.05), ** (p < 0.01), *** (p < 0.001) vs IRloxP; † (p < 0.05), †† (p < 0.01), ††† (p < 0.001) vs IRKO; ‡ (p < 0.05), ‡‡ (p < 0.01), ‡‡‡ (p < 0.001) vs IRA; § (p < 0.05), §§ (p < 0.01), §§§ (p < 0.001) vs IRB.

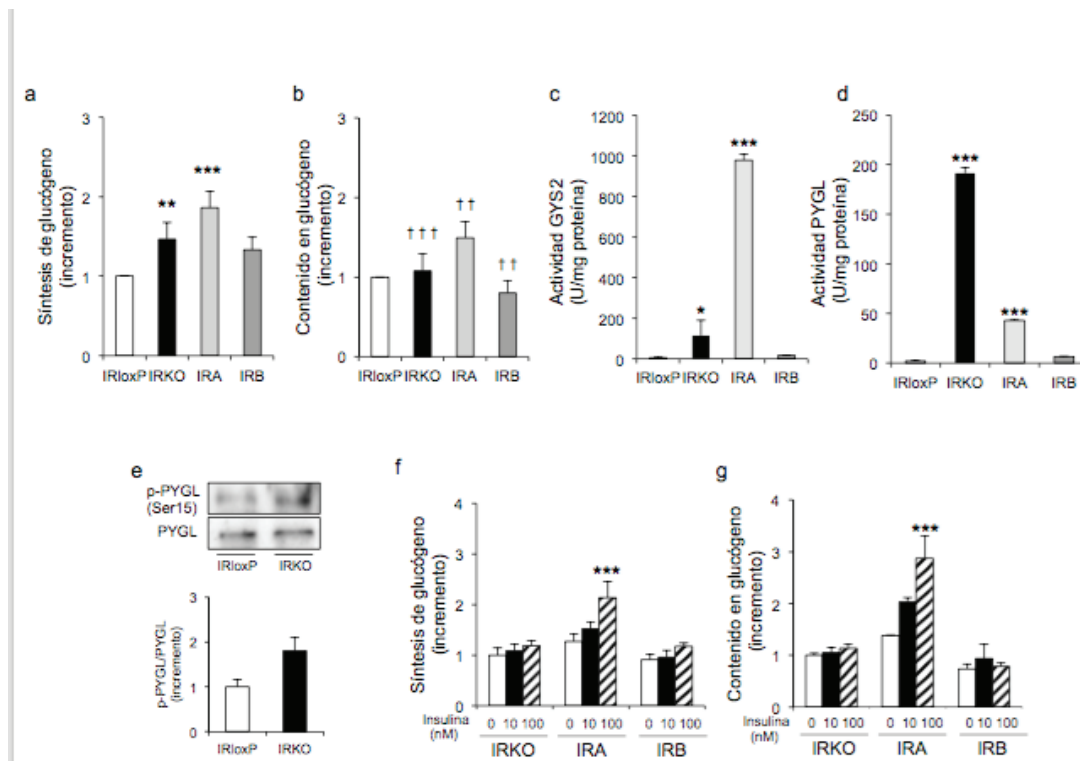


Figura 61. Regulación diferencial y acumulación de glucógeno por las isoformas del receptor de insulina.

a: Medida de la síntesis de glucógeno en condiciones basales.

b: Medida del contenido en glucógeno en condiciones basales.

c: Medida de la actividad de GYS2 en hepatocitos estimulados con insulina a 10 nM durante 15 min.

d: Medida de la actividad de PYGL en hepatocitos en medio de 5.5 mM de glucosa. **e:** Efecto de la glucosa 5.5 mM, en células deprivadas de suero, en la fosforilación de PYGL. PYGL es el control de carga.

e: Medida de la síntesis y **f:** Contenido en glucógeno. Los datos se representan como medias \pm SEM para cada grupo experimental (n=4). (a-d) Significatividad estadística evaluada mediante el test T-Student * (p < 0.01), ** (p < 0.01), *** (p < 0.001) vs IRloxP; †† (p < 0.01), ††† (p < 0.001) vs IRA. (f,g) Significatividad estadística evaluada mediante el test ANOVA *** (p < 0.001) vs IRA en condiciones basales.

su fosforilación si se compara con la situación basal. Como era de esperar, las células IRKO no responden a ninguna de las dosis de insulina probadas. En cuanto a las isoformas, la activación de PKB en los hepatocitos IRA es mayor que en los IRB. La activación de p70S6K es mayor en las células IRKO que en IRloxP y, de nuevo, mayor en IRA que IRB. En cuanto a la vía de las MAPKs, p44/42 se encuentran significativamente activadas en la dosis más alta de insulina empleada en comparación con la situación basal en los hepatocitos IRloxP e IRA. De nuevo no hay estimulación en las células deficientes de IR. Esta vía se encuentra menos activa en células IRB que IRA. La estimulación por insulina de la inhibición (fosforilación) de GSK3 α/β

es mayor en las células IRA a dosis de 10 nM que en cualquiera de las otras tres líneas estudiadas. Teniendo en cuenta estos resultados, estudiamos la fosforilación de GYS en los residuos Ser641 y Ser645, susceptibles de fosforilación por GSK3 α/β . Sorprendentemente, GYS2 está menos fosforilada en las células IRKO, lo que las predispone a sintetizar glucógeno. En cuanto a las isoformas, GYS2 está menos fosforilada en respuesta a insulina en los hepatocitos IRA que IRB (**Figura 60**).

En concordancia con la fosforilación de GYS2, la síntesis de glucógeno en condiciones basales está significativamente aumentada en las células IRKO en comparación con las IRloxP, ya que la actividad de

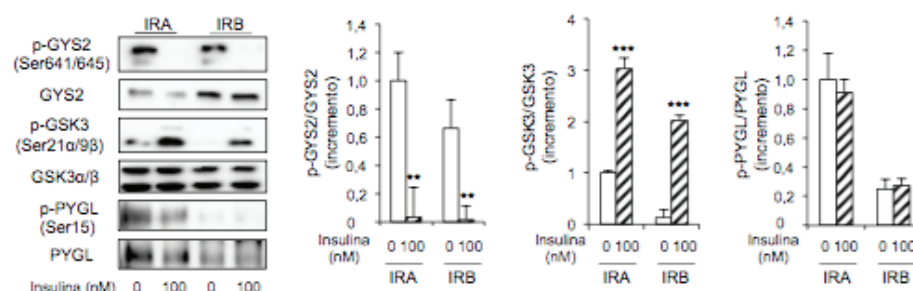


Figura 62. Regulación diferencial de la señalización de insulina en el metabolismo del glucógeno por las isoformas del receptor.

Efecto de la insulina sobre la fosforilación de GYS2, GSK3 α/β y PYGL en hepatocitos IRA e IRB. Las células se privaron de suero en medio con 5.5mM de glucosa durante 5 horas y, a continuación, se estimularon con insulina a 100 nM durante 5 min. GYS2, GSK3 α/β y PYGL se muestran como control de carga. Los histogramas muestran la cuantificación de la intensidad de las bandas. Los datos se representan como medias \pm SEM para cada grupo experimental (n=5) y la significación estadística como ** (p< 0.01), *** (p< 0.001) vs condiciones basales.

la GYS2 se encuentra significativamente incrementada. Sin embargo, el contenido en glucógeno no muestra diferencias significativas aunque la actividad de la PYGL está también incrementada en las células IRKO en comparación con las IRloxP. Además, aunque los niveles de PYGL total son similares entre las células IRloxP e IRKO, en estas últimas ésta tiende a estar más fosforilada, lo que sugiere una incrementada degradación de glucógeno. En cuanto a las isoformas, la síntesis de glucógeno en las células IRA está significativamente aumentada en condiciones basales en comparación con las IRloxP. Sin embargo, no hay diferencias significativas entre IRB e IRloxP. De acuerdo con los resultados de la síntesis, el contenido en glucógeno de las células IRA está aumentado significativamente en comparación con cualquiera de las otras tres líneas estudiadas (Figura 61).

En condiciones de estimulación con insulina a 100 nM durante 6 h, se observa un incremento significativo tanto en la síntesis como en el contenido en glucógeno en las células IRA en comparación con IRKO o IRB. De acuerdo con estos resultados

de respuesta a insulina, la GYS2 se defosforila tanto en hepatocitos IRA como IRB tras la estimulación con insulina a 100 nM durante 5 min. Sin embargo, en las mismas condiciones se observa una menor fosforilación en GSK3 α/β así como en PYGL en los hepatocitos IRB, lo que sugiere que las células IRA e IRB tienen una tasa de reemplazo de glucógeno distinta (Figura 62).

Además de las modificaciones covalentes, la GYS hepática se regula por G6P, activador alostérico positivo. Los niveles de glucosa incluso pueden provocar cambios en la expresión de algunas proteínas de la vía de la insulina. Para poder determinar de forma independiente los efectos de la glucosa de los de la insulina en la activación de la GYS2, analizamos los efectos de la ausencia total de glucosa, normoglucemia (5.5 mM) e hiperglucemia (25 mM) en hepatocitos IRA e IRB en ausencia de insulina. En estas condiciones, aunque los niveles totales de GSK3 α/β son similares en células IRA e IRB, la fosforilación de la subunidad α en IRB no ocurre a ninguna de las tres concentraciones de glucosa ensayadas. En coherencia con lo anterior, GYS2 se encuentra menos fosforilada en

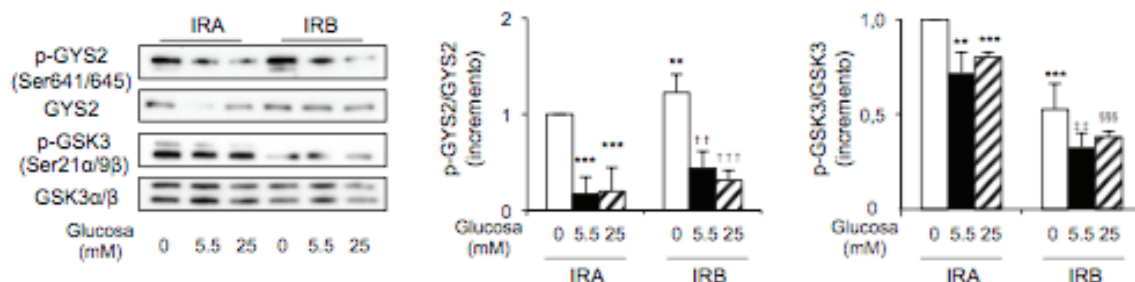


Figura 63. Regulación diferencial de la glucosa en la señalización del metabolismo del glucógeno por las isoformas del receptor de insulina.

Efecto de la glucosa en la fosforilación de GYS2 y GSK3α/β en hepatocitos IRA e IRB. Las células se privaron de suero en medio con 5.5 mM o 25 mM de glucosa durante 5 horas. GYS2 y GSK3α/β se muestran como control de carga. Los histogramas muestran la cuantificación de la intensidad de las bandas. Los datos se representan como medias ± SEM para cada grupo experimental (n=5) y la significación estadística como ** (p< 0.01), *** (p< 0.001) vs IRA en condiciones basales; †† (p< 0.01), ††† (p< 0.001) vs IRB en condiciones basales; ‡‡ (p< 0.01) vs IRA a 5.5 mM de glucosa; §§§ (p< 0.001) vs IRA a 25 mM de glucosa.

hepatocitos IRA en ausencia de glucosa en comparación con IRB en las mismas condiciones; sin embargo, en condiciones de hiperglucemia, muestran niveles de fosforilación similares (Figura 63).

IMPORTANCIA DEL IGF-IR EN EL METABOLISMO LIPÍDICO HEPÁTICO

En el hígado, la resistencia a insulina no sólo afecta a la incapacidad de la insulina a activar su receptor o a la supresión incompleta de la producción de glucosa hepática, sino también a la lipogénesis. Por tanto, el estudio de la regulación de estas vías metabólicas en un ambiente de resistencia a insulina *in vivo*, en los ratones iLIRKO, resulta fundamental. Además, puesto que el receptor de IGF-I tiene un papel metabólico clave en la síntesis lipídica (Aguirre *et al.*, 2016), y su receptor podría compensar las acciones del IR en ausencia de éste, estudiamos también la regulación metabólica lipídica en el ratón iLIRIGFIRKO (*inducible Liver Insulin Receptor Insulin-like Growth Factor*

type I Receptor KnockOut) al que me referiré, para simplificar, como DKO (Doble *KnockOut*). Estos ratones muestran un perfil de intolerancia a glucosa y resistencia a insulina menos acusado que el de los ratones iLIRKO (Figura 64a,b). Además, los niveles de insulina circulantes en estos ratones tienden a ser más altos que los de los ratones Control, pero no alcanzan la hiperinsulinemia de los ratones iLIRKO (Figura 64c).

Nuestros resultados muestran una marcada disminución en el contenido en triglicéridos hepáticos, aunque no en suero, en los ratones DKO en comparación con los ratones Control o iLIRKO en condiciones de 24 h de ayuno + 1 h de realimentación (Figura 65). Para entender esta bajada, investigamos la ruta de la *lipogenesis de novo* (DNL) en las mismas condiciones. Empezamos analizando la expresión de mRNA de dos de los principales genes lipogénicos (Figura 66). No encontramos diferencias significativas entre los tres genotipos estudiados en cuanto a los niveles de mRNA de *Srebp-1c*. Sin embargo, los niveles de *Evl6*, elongasa implicada en la

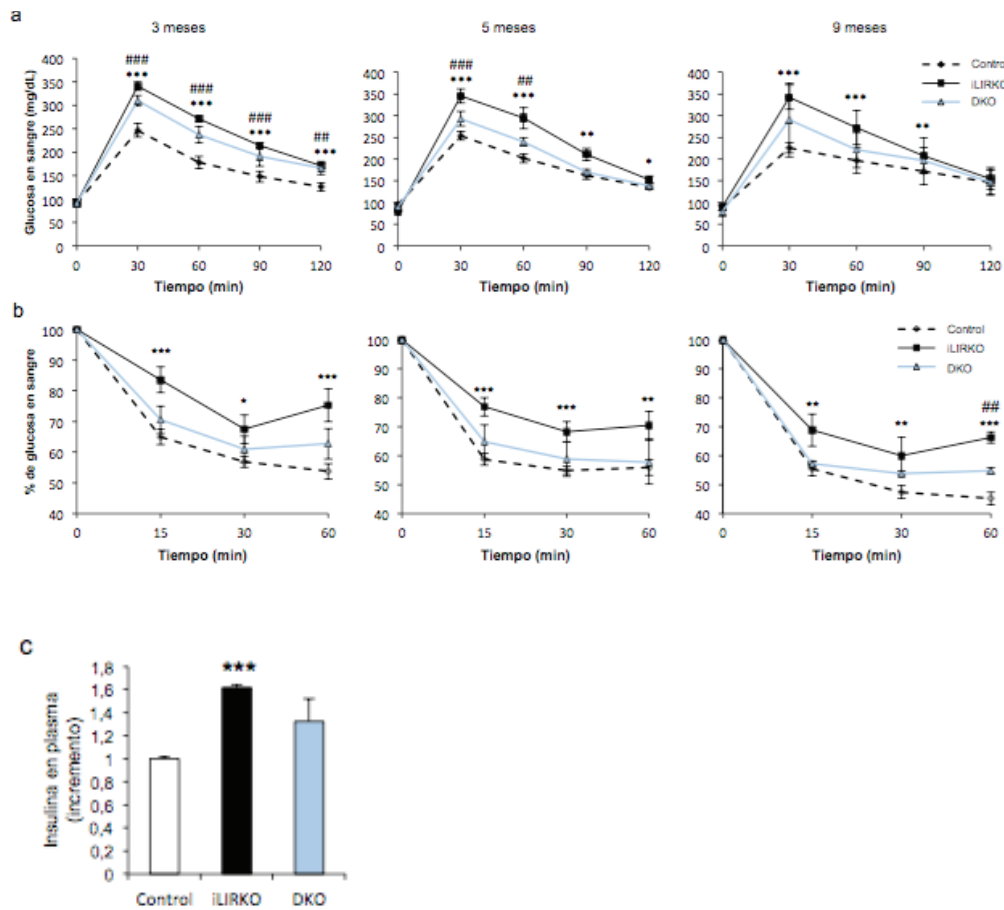


Figura 64. Efectos metabólicos de la eliminación del receptor de IGF-I en el hígado.

a: Test de tolerancia a glucosa intraperitoneal en ratones Control, iLIRKO y DKO de 3, 5 y 9 meses de edad (n=10 animales por grupo).

b: Test de tolerancia a insulina intraperitoneal en ratones Control, iLIRKO y DKO de 3, 5 y 9 meses de edad (n=10 animales por grupo).

c: Niveles de insulina en plasma en animales de 5 meses de edad ayunados durante 16 horas. Los datos se presentan como media \pm SEM para cada grupo (n=5). La significación estadística se expresa como Control vs iLIRKO *** (p<0.001).

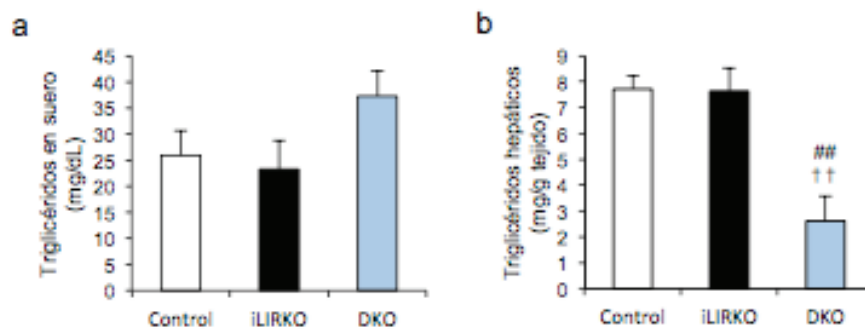


Figura 65. Los ratones DKO presentan un defecto significativo en el contenido en triglicéridos hepático.

a: Triglicéridos en suero.

b: contenido en triglicéridos hepáticos en ratones Control, iLIRKO y DKO de 5 meses de edad ayunados 24 h seguido de 1 h de realimentación. Los datos se presentan como media \pm SEM para cada grupo (n=5 animales por grupo) y la significación estadística como Control vs DKO ## (p<0.01); iLIRKO vs DKO $\dagger\dagger$ (p<0.01).

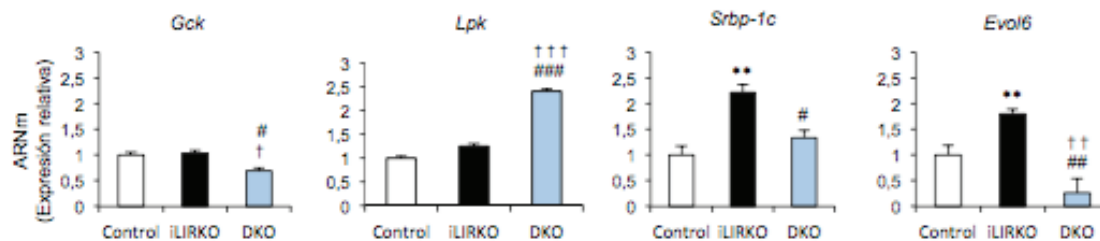


Figura 66. Expresión de ARNm de factores lipogénicos.

Se midió la expresión relativa del ARNm por qPCR de *Gck*, *Lpk*, *Srebp-1c* y *Evol6* en hígados de ratones Control, iLIRKO y DKO de 5 meses de edad ayunados 24 h seguido se 1 h de realimentación. Los datos se presentan como media \pm SEM para cada grupo (n=5 animales por grupo) y la significación estadística como Control vs iLIRKO * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001); Control vs DKO # (p<0.05), ## (p<0.01), ### (p<0.001); iLIRKO vs DKO † (p<0.05), †† (p<0.01), ††† (p<0.001).

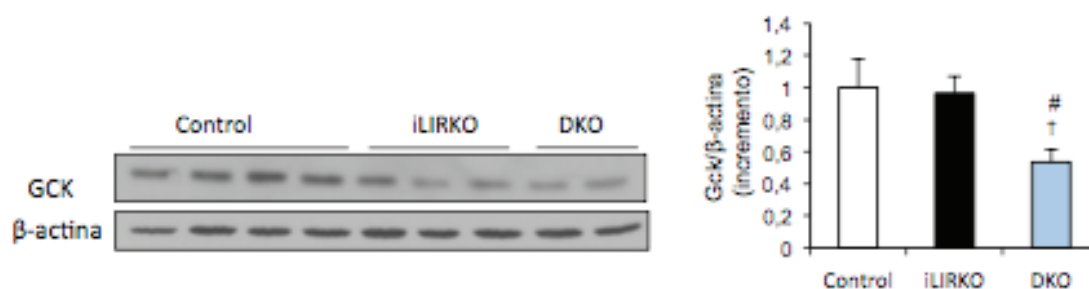


Figura 67. La expresión de la glucoquinasa está reducida en los ratones DKO.

Western Blot representativo de la medida de la expresión de GSK en hígados de ratones Control, iLIRKO y DKO de 5 meses de edad ayunados 24 h seguido de 1 h de realimentación. El histograma muestra la cuantificación de la intensidad de las bandas. Los datos se presentan como media \pm SEM para cada grupo (n=4 animales por grupo) y la significación estadística como Control vs DKO # (p<0.05); iLIRKO vs DKO † (p<0.05)

síntesis de ácidos grasos de cadena larga, se encuentran disminuidos en los ratones DKO en comparación con los ratones Control o iLIRKO. Por otro lado, tal y como se espera en un proceso de DNL no alterado, los niveles de *Gck* de ratones DKO se reducen en comparación con los ratones de otros genotipos. Los resultados obtenidos se confirmaron además a nivel de proteína (Figura 67). Sin embargo, los niveles de *Pck*, se mantienen elevados con respecto al Control e iLIRKO. Estos resultados parecen indicar que la bajada en triglicéridos hepáticos en los ratones

DKO podría deberse a la reducción en *Gck* y *Evol6*.

Para profundizar en el metabolismo lipídico, evaluamos el contenido en colesterol hepático y en suero. Los ratones DKO muestran un aumento significativo en el contenido en colesterol hepático comparado con los ratones Control e iLIRKO. Sin embargo, los niveles en suero no se ven incrementados en comparación con los ratones Control. Al contrario que los ratones DKO, los ratones iLIRKO presentan igual contenido hepático de colesterol que

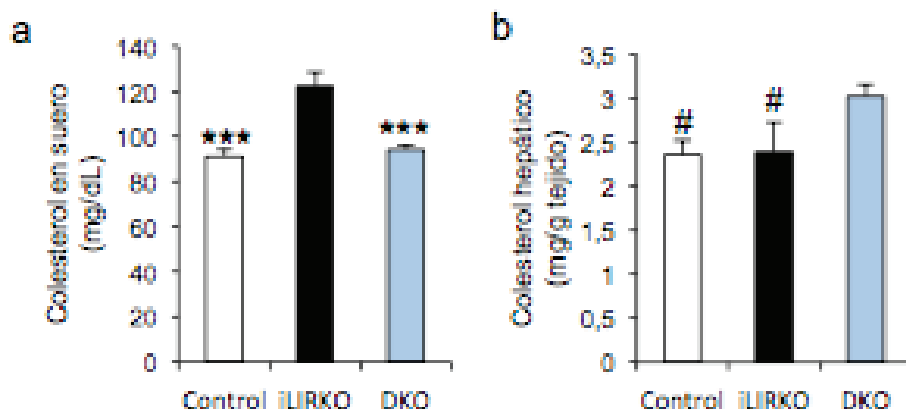


Figura 68. Efectos metabólicos de la eliminación del receptor de insulina en el hígado.

a: Colesterol en suero.

b: contenido en colesterol hepático en ratones Control, iLIRKO y DKO de 5 meses de edad ayunados 24 h seguido de 1 h de realimentación. Los datos se presentan como media \pm SEM para cada grupo (n=5 animales por grupo) y la significación estadística como vs iLIRKO *** ($p < 0.005$); vs DKO ($p < 0.05$).

los ratones Control, pero un significativo aumento en suero (**Figura 68**). Para entender en profundidad qué ocurría en el suero de esos animales, analizamos las partículas HDL, ya que son la forma mayoritaria de colesterol circulante en el ratón. El análisis por FPLC (*Fast protein liquid chromatography*) del suero muestra una reducción del, aproximadamente, 50 % de μg de colesterol por fracción en las partículas HDL de los ratones DKO en comparación con los ratones Control o iLIRKO. Además, el tamaño de estas partículas estaba disminuido ya que el pico de elución ocurría en la fracción 44, mientras que en los ratones Control e iLIRKO ocurre en la 42. En concordancia con los datos de colesterol en suero, los ratones iLIRKO presentan mayor contenido en colesterol que los ratones Control y un ligero incremento en el número de partículas HDL más pequeñas (**Figura 69a**). Para saber si la reducción en los niveles de colesterol en suero era debida a un menor contenido de colesterol por partícula o a un menor número de partículas totales, evaluamos el perfil de expresión de ApoA. Como sólo una partícula de ApoA se expresa por molécula de HDL, la cantidad de HDL es directamente

proporcional a la de ApoA. Para una primera evaluación, agrupamos las fracciones pertenecientes al mismo perfil según el patrón obtenido para el FPLC en 5 grupos (A: fracciones 27-30, B: fracciones 31-33, C: fracciones 34-36, D: fracciones 37-41, E: fracciones 42-44). En concordancia con el perfil obtenido por FPLC, los niveles de ApoA disminuyeron en los ratones DKO en comparación con ratones Control e iLIRKO y su pico de expresión se desplazó al grupo E (**Figura 69b**). Analizamos de nuevo el contenido de ApoA, esta vez por fracción (39, 41, 42, 44 y 45) y de nuevo observamos el mismo efecto, menor contenido en los ratones DKO, lo que implicaba un menor número de partículas HDL en estos animales. Además, este análisis minucioso nos mostró que la presencia de ApoA era mayor en las fracciones 41, 42, 44 y 45 de los ratones iLIRKO en comparación con los ratones Control, también en consonancia con los resultados de la FPLC. Estos resultados nos indicaban que los ratones iLIRKO tienen mayor número de partículas HDL (**Figura 69c**).

Los análisis por FPLC mostraron también una reducción de contenido en colesterol

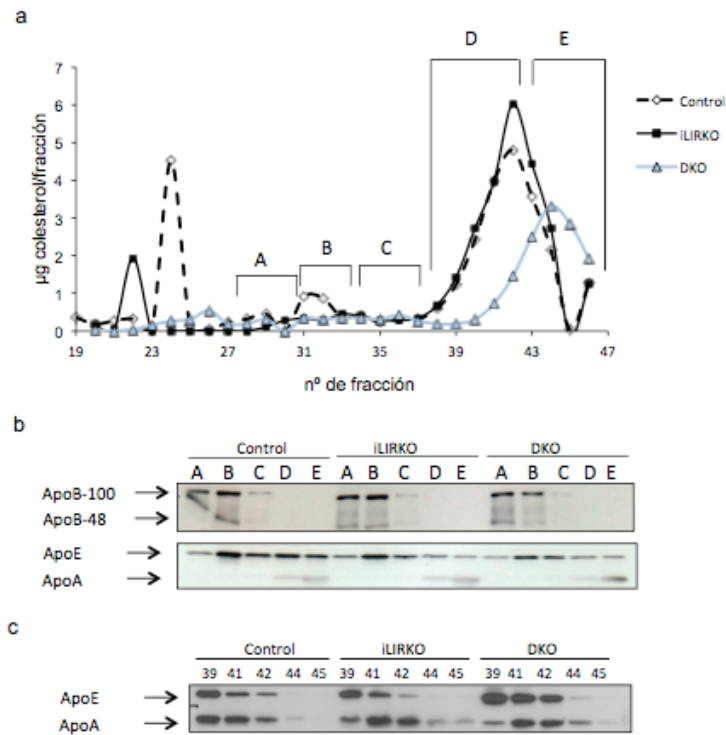


Figura 69. Los ratones DKO presentan un menor contenido en colesterol en las partículas HDL y un menor número de éstas. **a:** El suero de los ratones se analizó por FPLC y se midió el contenido en colesterol de cada una de las fracciones. Los datos se presentan como una media de 4 ratones por genotipo ya que, para llevar a cabo la FPLC, se hizo un pool con el suero de los 4. **(b,c)** Los niveles de las apolipoproteínas del suero sujeto al fraccionamiento mediante FPLC se analizaron por WB. **b:** se analiza un pool de fracciones por pocillo (indicadas con número) con el mismo volumen de cada fracción por grupo (indicados con letras) (A:28, 29, 30; B: 31, 32, 33; C: 34, 35, 36, 37; D: 38, 39, 40, 41, 42; D: 43, 44, 45, 46). **c:** se analizan las apolipoproteínas de la fracción que se indica.

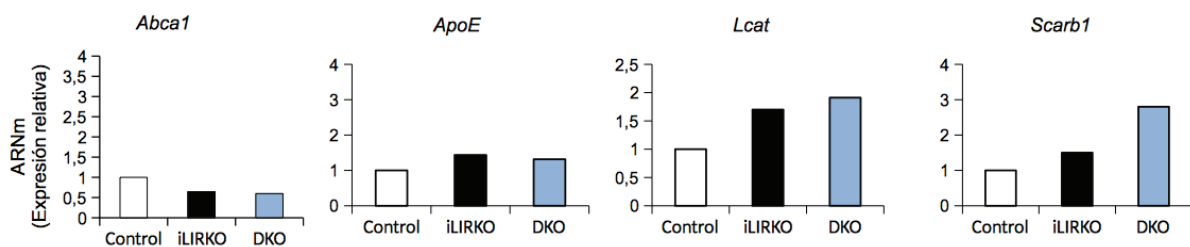


Figura 70. Expresión de ARNm de factores implicados en el transporte reverso del colesterol. Se midió la expresión relativa del ARNm por qPCR de *Abca1*, *ApoE*, *Lcat* y *Scarb1* en hígados de ratones Control, iLIRKO y DKO de 5 meses de edad ayunados 24 h seguido se 1 h de realimentación. Los datos se presentan como media \pm SEM para cada grupo (n=5 animales por grupo) y la significación estadística como Control vs iLIRKO * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$); Control vs DKO # ($p < 0.05$), ## ($p < 0.01$), ### ($p < 0.001$).

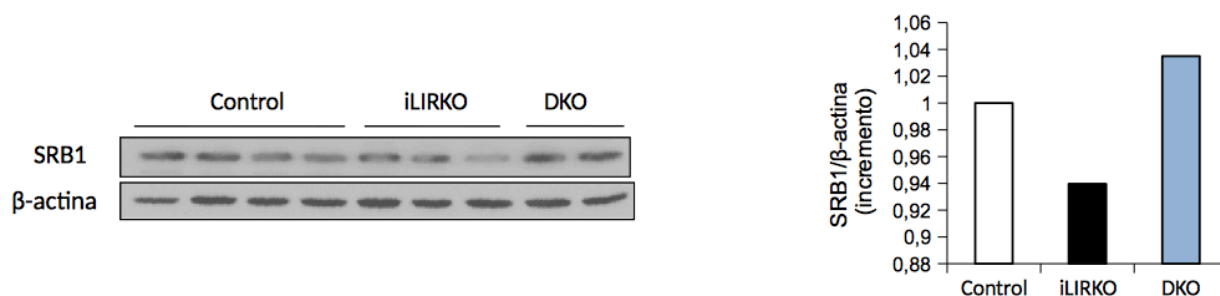


Figura 71. La expresión de SRB1 en hígado no varía entre los ratones Control, iLIRKO o DKO. Western Blot representativo de la medida de la expresión de SRB1 en hígados de ratones Control, iLIRKO y DKO de 5 meses de edad ayunados 24 h seguido de 1 h de realimentación. El histograma muestra la cuantificación de la intensidad de las bandas. Los datos se presentan como media \pm SEM para cada grupo (n=4 animales por grupo).

en las partículas LDL y, en concordancia, en los niveles de ApoB100 y ApoB48, principales lipoproteínas de las partículas LDL y VLDL. Resulta interesante que los niveles de ApoE por grupos se vean reducidos en el DKO, pero estén más aumentados en las fracciones 39, 41, 42 y 44 (Figura 69c). Por tanto, aunque la falta del IR e IGF-IR en el hígado no altere los niveles totales de colesterol en suero, produce una distribución alterada del perfil lipoproteico.

Para continuar con la caracterización de las partículas HDL y ahondar en los mecanismos de por qué éstas tienen un perfil diferente según el genotipo a estudiar, investigamos el transporte reverso del colesterol, en el cual están directamente implicadas estas partículas. El colesterol se transporta a través de ABCA1 desde diferentes tejidos, entre los que se incluye el hígado, a las partículas HDL nacientes. SRB1 facilita la captación de los ésteres de colesterol por el hígado de las HDL. Este proceso facilita el movimiento del colesterol desde los tejidos periféricos hacia el hígado para su excreción. Así, estudiamos los niveles de ARNm por PCR cuantitativa de los principales genes implicados en este proceso. No se observan cambios significativos entre los tres genotipos estudiados ni en *ApoE* ni en *Lcat*. Los niveles

de *Abca1* en los ratones DKO son significativamente más bajos que los del Control. En cuanto a *Scarb1*, sus niveles están significativamente aumentados en ratones iLIRKO en comparación con ratones Control o DKO (Figura 70). Sin embargo, no se observan diferencias significativas a nivel de proteína SRB1 (Figura 71). El defecto en *Abca1*, junto con otros factores no estudiados, podría explicar el defecto en partículas HDL nacientes así como el aumento en el contenido de colesterol hepático en los ratones DKO (Figura 70). En cuanto a los animales iLIRKO, sus niveles normales de SRB1 no explican el acúmulo de partículas HDL con gran contenido en colesterol por lo que este efecto requiere estudios más en profundidad.

08/

discusión

iLIRKO, modelo de progresión a la diabetes tipo 2 sin daño hepático

La diabetes tipo 2 es una enfermedad poligénica que implica diversos polimorfismos en diferentes genes que codifican para proteínas que participan en la cascada de señalización de la insulina, en su secreción y en su metabolismo intermedio (Saltiel y Kahn, 2001). Los modelos animales han conseguido proporcionar conocimientos moleculares del papel de diferentes vías de señalización implicadas en la modulación de la homeostasia glucídica. Cómo y cuáles de esos genes contribuyen a la enfermedad en humanos requiere una investigación más en profundidad. Estos polimorfismos, en combinación con factores ambientales concretos y un determinado estilo de vida, participan también en el desarrollo de la diabetes tipo 2 y dan lugar a una manifestación compleja de la enfermedad. Sin embargo, aunque estos factores no estén del todo claros, es evidente que tanto la resistencia a insulina como el fallo de la célula β son esenciales

para el desarrollo completo de la enfermedad (Neubauer y Kulkarni, 2006).

En este sentido, el ratón iLIRKO se postula como un buen modelo para el estudio de la diabetes tipo 2. Este modelo muestra resistencia a insulina hepática inicial, debida a la deficiencia en el receptor de insulina hepático, y, como mecanismo de compensación, desarrolla una marcada hiperinsulinemia, consecuencia de un incremento en la masa de célula β . Además, la generación de un modelo animal para el estudio de una enfermedad debe minimizar al máximo los efectos colaterales que puedan surgir de su manipulación genética. Un ejemplo claro son los modelos *knockout* globales para el receptor de insulina, que en su gran mayoría han fracasado por una muerte prematura del animal. En consecuencia, los modelos inducibles cobraron una importante relevancia. Sin embargo, algunos autores han puesto en entredicho los métodos de inducción utilizados, concretamente el tamoxifeno. Algunos autores describen al

tamoxifeno como un *pro-drug* ya que se metaboliza a diferentes compuestos, que son antiestrógenos más potentes que él mismo, ya que presenta baja afinidad por los receptores de estrógenos. Uno de sus metabolitos activos, generado por las isoformas del citocromo P450 (CYP) CYP2D6 y CYP3A4 en el hígado, es el 4-hidroxitamoxifeno (4-OHT). La adición del grupo 4-hidroxilo al tamoxifeno aumenta notablemente su afinidad por los receptores de estrógenos y compite por la unión a éstos con los estrógenos propios del organismo (Desta *et al.*, 2004, Johnson *et al.*, 2004). El 4-OHT es prohibitivamente caro y, en consecuencia, la mayoría de los estudios *in vivo* utilizan en su lugar tamoxifeno, el cual es más barato y se metaboliza rápidamente a 4-OHT (Desta *et al.*, 2004). En contrapartida, el tamoxifeno presenta una vida media corta *in vivo*, de 16 h aproximadamente, y es poco soluble en preparaciones acuosas. Por tanto, la mayoría de los estudios que presentan resultados consistentes en cuanto a la activación del ER^{TAM} fusionado a diferentes proteínas, se han obtenido mediante inyecciones intraperitoneales diarias de tamoxifeno diluido en aceite vegetal. Sin embargo, debido a la acumulación de aceite en la cavidad intraperitoneal de los animales, este método de administración deriva, en repetidas ocasiones, en el desarrollo de una peritonitis aséptica. Por tanto, el desarrollo de la estrategia presentada en esta tesis para la inducción de la delección del receptor de insulina mediante la administración oral de tamoxifeno en la dieta, evita estos daños derivados de la administración no fisiológica del compuesto. Además, ratones alimentados a largo plazo a base de dieta de tamoxifeno, hasta 18 semanas, no presentan signos de enfermedad. Trabajos previos describen una pérdida del 16 % de peso en los ratones durante la primera semana en la que son alimentados con dieta de tamoxifeno, debido a la afagia

derivada de la falta de palatabilidad de esta dieta. En nuestro caso, la pérdida de peso no fue tan acusada, sino que el peso de los ratones durante la primera semana se mantuvo, no generando ganancia. Tras esta semana, los ratones recuperan el peso normal y continúan sanos, sin presentar signos de enfermedad en ningún tejido (Díaz-Castroverde *et al.*, en revisión; Wilson *et al.*, 2014).

Otro problema derivado de la delección de un gen es el momento en el que se induce esa delección. Los ratones LIRKO, que pierden el receptor de insulina hepático ya durante el desarrollo embrionario, presentan una marcada displasia celular hepática que se inicia a los 2 meses de edad (Michael *et al.*, 2000). Cuando el daño celular se agudiza, a los 6 meses de edad, logra revertir la hiperglucemia, previamente generada por la resistencia a insulina hepática consecuencia directa de la falta del receptor de insulina en el hígado (Michael *et al.*, 2000). Sin embargo, en los ratones iLIRKO este efecto no ocurre, mantienen su fenotipo y no desarrollan en ningún momento nódulos hiperplásicos hepáticos. Esto demuestra dos cosas: que el IR desempeña un papel clave durante el desarrollo embrionario hepático que el IGF-IR no es capaz de compensar y que el momento de la retirada del receptor de insulina es clave para generar un buen modelo para el estudio de la diabetes tipo 2, aunque esta última reflexión es, por supuesto, extrapolable a cualquier enfermedad.

Siguiendo en la línea de la salubridad hepática, no sólo el tamoxifeno o la falta del receptor de insulina se han considerado como candidatos para poder alterarla. La expresión de la isoforma A del receptor de insulina se ha asociado con situaciones de malignidad celular. En concreto, IRA presenta alta afinidad por IGF-II en líneas

tumorales de fibroblastos y, estudios previos en hepatocarcinomas humanos, cáncer de mama y cáncer de colon, relacionan la sobreexpresión de esta isoforma con el desarrollo de la patogénesis de esta enfermedad (Frasca *et al.*, 1999; Chettouh *et al.*, 2013). Sin embargo, aunque en los ratones iLIRKO IRA en torno al 90 % de la expresión del IR pertenece a la isoforma A, no presentan signos de displasia celular, incluso a tiempos largos, cuando se ha descrito que se produce el desarrollo de hepatocarcinoma en modelos animales (Chettouh *et al.*, 2013). Además, la expresión de IRA no incrementa la proliferación hepatocelular en estos ratones, por lo que se descarta que puedan desarrollar un proceso de hiperplasia/displasia celular.

El hígado posee la capacidad de adaptarse rápidamente a los cambios en la concentración de glucosa debido a su papel principal en el mantenimiento de la homeostasia glucídica (El Ouaamari *et al.*, 2013). Sin embargo, su papel en la progresión de la resistencia a insulina e hiperglucemia en ayuno se desconocen. Estudios previos con ratones *knockout* condicionales y reconstituidos concluyen que la progresión de la resistencia a insulina a la diabetes con hiperglucemia en ayuno requieren defectos en otros tejidos además de en el hígado. Sin embargo, nuestros resultados muestran que la eliminación inducida del receptor de insulina en el hígado, induce el desarrollo de intolerancia a la glucosa crónica e hiperinsulinemia. Por tanto, el modelo iLIRKO que se presenta en este trabajo, demuestra que la resistencia a insulina primaria es necesaria y suficiente para generar la patogénesis progresiva de la diabetes tipo 2.

Regulación de la hiperglucemia en ratones iLIRKO IRA: asociación de la isoforma A del receptor de insulina con el GLUT2

A pesar de los periodos de alimentación y ayuno, los niveles de glucosa en plasma se mantienen en un margen estrecho entre 4 y 7 mM en individuos sanos (Saltiel y Kahn, 2001). Como la glucosa es la fuente principal de la energía metabólica en la mayoría de las células, este control, para mantener la glucemia en torno a 5 mM, se consigue gracias a un control riguroso en su absorción, producción por el hígado y su consumo y metabolismo por los tejidos periféricos. Así, la insulina aumenta la captación de glucosa en el músculo y el tejido adiposo e inhibe la producción de glucosa hepática (Saltiel y Kahn, 2001). La insulina promueve también el crecimiento celular y su diferenciación, y promueve el almacenamiento de sustratos en el tejido adiposo, hígado y músculo por medio de la estimulación de la lipogénesis, glucogénesis y síntesis de proteínas (Saltiel y Kahn, 2001). La diabetes tipo 2 se caracteriza por una señalización de insulina desequilibrada debido a la hiperinsulinemia compensatoria (Malaguarnera y Belfiore, 2011). Se ha demostrado que, en estados de resistencia a insulina, la insulina pierde su capacidad de suprimir la producción de glucosa, aunque mantiene durante más tiempo su capacidad para dirigir la lipogénesis (Cook *et al.*, 2015). Esta selectividad de la resistencia a insulina en diabetes tipo 2 tiene importantes implicaciones en cuanto a su terapia. Parece preferible buscar nuevos agentes que mejoren la sensibilidad a insulina para así mejorar la cascada de señalización y suprimir la gluconeogénesis, así como agentes que sean capaces de aumentar la captación de glucosa para disminuir la hiperglucemia (Brown y Goldstein, 2008).

En este sentido, nuestro grupo ha descrito que la presencia o ausencia de una u otra de las isoformas del receptor de insulina implica cambios en el perfil metabólico. Concretamente, la expresión de la isoforma A, pero no la B, en hepatocitos neonatales mejora la captación de glucosa debido a su asociación con GLUT2 (Nevado *et al.*, 2006). Teniendo en cuenta que la afinidad por la insulina es la misma en ambas isoformas y que además, la captación de glucosa en el hígado es independiente de esta hormona, estos cambios no pueden achacarse a la unión de la insulina a su receptor. Debe tenerse en cuenta que el extremo α carboxi-terminal del IR es una de las zonas críticas para la interacción con el ligando. Esta zona comprende entre los residuos 704-719, pero tolera la inserción de 12 aminoácidos extra (IRB) entre los residuos 717 y 718 (Menting *et al.*, 2013). En el caso del IGF-IR, esta región es prácticamente homóloga a la del receptor de insulina, excepto en la Val 712 y Val 715, pero no admite la inclusión de los 12 aminoácidos extra (Menting *et al.*, 2013). El hecho de que se conserve igual afinidad, indica que existe una gran plasticidad en las interfaces de unión proteína-proteína y que la insulina emplea un modo diferente para unirse a cada isoforma, lo cual sea, probablemente, consecuencia de una coevolución entre la molécula de insulina y su receptor (Benyoucef *et al.*, 2007; Whittaker *et al.*, 2002). Sin embargo, estudios de mutagénesis en diferentes residuos de los dominios que conforman el sitio de unión a ligando del receptor de insulina, demuestran que sí existen diferencias en su estructura, aunque no en su afinidad por el ligando (Whittaker *et al.*, 2002). Esta disimilitud está apoyada por el hecho de que las isoformas del IR presentan diferente afinidad por los IGFs. Además, estas variaciones estructurales, según la presencia/ausencia del exón 11, podrían explicar el hecho de que sea una isoforma y no la

otra la que se asocie al GLUT2. Estas asociaciones han sido descritas de nuevo por Root-Bernstein y Vonck en 2009, aunque, en este caso, se postula que además la glucosa podría jugar un papel directo en la interacción (Root-Bernstein y Vonck, 2009).

En hepatocitos, GLUT2, junto con otras moléculas, es considerado uno de los “sensores de glucosa”, entendiendo como tal, cualquier mecanismo molecular cuya actividad sea una respuesta directa a cambios en las concentraciones fisiológicas de glucosa. GLUT2 actúa en otros tipos celulares, por ejemplo, en las células β pancreáticas, en las cuales desempeña un papel fundamental, ya que es absolutamente necesario para la secreción de insulina dependiente de glucosa. Volviendo a los hepatocitos, tal y como demuestra el *knockout* para GLUT2 en hígado (modelo LG2KO), GLUT2 es completamente necesario para equilibrar las concentraciones intra y extracelulares de glucosa que controlan a su vez a los genes hepáticos cuya expresión es susceptible a la concentración de glucosa. Sin embargo, esta regulación tiene matices, ya que GLUT2 es indispensable para la captación de glucosa, pero dispensable para su salida, la cual podría producirse por un mecanismo alternativo en el que estarían involucrados una vía de transporte a través de membrana originada en el RE (Eisenberg *et al.*, 2005). Además, como ya se ha comentado, IRA es un modulador de GLUT2 ya que aumenta la captación de glucosa *in vitro* (Nevado *et al.*, 2006). Esta asociación entre GLUT2 e IR β se repite de nuevo en nuestro modelo *in vivo*, en el que está significativamente aumentada en iLIRKO IRA en comparación con iLIRKO IRB. Así, de acuerdo con los resultados previos *in vitro*, en los ratones iLIRKO IRA podría producirse un incremento en la captación de glucosa a nivel hepático.

Por tanto, teniendo en cuenta que la hiperglucemia fundamentalmente decrece en ratones iLIRKO IRA y el papel primordial de GLUT2 en la captación de glucosa, éste podría proponerse como un mecanismo para la mejora de la intolerancia a glucosa.

La disminución de la hiperglucemia mejora la hiperinsulinemia y modifica la masa de célula β en iLIRKO IRA

Por todas las razones expuestas a lo largo de esta tesis, es necesario diseccionar el papel de cada isoforma *in vivo* en el hígado y caracterizar más a fondo su posible uso como herramienta para disminuir los niveles de glucosa circulante. Nuestros resultados demuestran que la resistencia a insulina global y, como consecuencia, la homeostasia glucídica, pueden verse modificadas por la expresión de IRA, pero no IRB, en el hígado. La expresión selectiva de IRA es capaz de restablecer la tolerancia a glucosa y la resistencia a insulina, mientras que IRB sólo mejora parcialmente la sensibilidad a insulina.

Además, nuestros resultados demuestran una recuperación mantenida en el tiempo de los niveles de insulina en los ratones iLIRKO IRA acompañada por una disminución en la masa de célula β hasta valores de los ratones Control. Estos resultados sugieren que, como ocurre en condiciones fisiológicas durante el embarazo (Huang *et al.*, 2009; Rieck y Kaestner, 2010; Scaglia *et al.*, 1997; Sorenson y Brelje, 1997) la masa de célula β se adapta, variando su tamaño, para conseguir una mejora en la sensibilidad a insulina. De este modo, teniendo en cuenta que la insulina afecta a todos los tejidos, sería un reto identificar las señales que promueven el crecimiento o regresión de los islotes de masa de célula β pancreática, en estados de resistencia a insulina. Considerando que no

se ha detectado un aumento de masa de célula β en ningún otro modelo de resistencia a insulina, (Brüning *et al.*, 1998; Brüning *et al.*, 2000; Kulkarni *et al.*, 1999) se podría especular con un papel regulador del hígado en este proceso. Las señales y proteínas que median la respuesta compensatoria de los islotes en respuesta a resistencia a insulina no se conocen en profundidad. La glucosa per se promueve el crecimiento de la masa de célula β (Assmann *et al.*, 2009; Bonner-Weir *et al.*, 1989) y es un posible candidato para la inducción de la hiperplasia de célula β hallada en los ratones iLIRKO, los cuales presentan además una marcada hiperglucemia. Sin embargo, otros factores deben estar implicados y el ejemplo más claro es que el suero de ratones LIRKO aumenta la proliferación en islotes humanos, lo cual indica que, al menos un factor derivado del estado a resistencia a insulina hepática es capaz de inducir cambios fisiológicos en la masa de célula β . Concretamente, el IGF-I fue descrito por nuestro grupo como posible molécula comunicadora en el eje hígado-páncreas. En concreto, nuestros resultados muestran que la expresión hepática del IGF-I se ve incrementada en los ratones iLIRKO y disminuye en los ratones iLIRKO IRA, pero no en los ratones iLIRKO IRB. Además, los niveles de IGF-I hepático observados se correlacionan con cambios en la homeostasia glucídica (disminución de la hiperglucemia), lo que sugiere que ambos factores, IGF-I y glucosa, deben verse implicados en la regulación de la masa de célula β en los ratones iLIRKO. Por todo ello, y con la necesidad de un análisis en mayor profundidad, podría especularse que el IGF-I podría ser un biomarcador de resistencia a insulina hepática.

Para investigar más en profundidad la regresión de la masa de célula β observada, se evaluó su nivel de proliferación en

los diferentes grupos estudiados mediante la localización nuclear de PCNA. Las células β adultas proliferan de forma lenta en situaciones fisiológicas, sin embargo, en una situación patológica, como la de resistencia a insulina observada en los ratones iLIRKO, la proliferación está altamente incrementada. Nuestros resultados muestran que la expresión hepática de IRA es capaz de reducir la masa de célula β a través de la disminución de la proliferación de ésta a valores similares a los de los ratones Control.

Teniendo en cuenta todo lo descrito, este estudio remarca el papel central y complejo que desempeñan las isoformas del receptor de insulina hepáticas en el control del metabolismo de la glucosa. En base a los hallazgos aquí descritos, la expresión de la isoforma A con AAVs mediante ensayos de terapia génica, podría aumentar la captación de glucosa y regular de este modo la homeostasia glucídica y el crecimiento de la masa de célula β . Si estos factores no se regulan desencadenarían en el fallo total de las células β y, en consecuencia, en diabetes tipo 2.

Papel diferencial de las isoformas del receptor de insulina en la síntesis de glucógeno *in vivo*

Como se ha ido comentando a lo largo de esta tesis, diversas cuestiones que rodean a las isoformas del IR permanecen inconclusas, especialmente aquellas que conciernen a cuestiones referentes a su papel fisiológico. Además, el modo por el cual activan de forma diferencial las distintas cascadas de señalización en respuesta a insulina, necesitaba de un mayor esclarecimiento. Por ello, centramos nuestro estudio en la vía de la síntesis de glucógeno en la que además la glucosa juega un papel fundamental.

La glucosa modifica el metabolismo celular mediante regulación alostérica y transcripcional. Inhibe la lisis de glucógeno mediante la activación de la glucógeno fosforilasa quinasa, la cual inactiva a la glucógeno fosforilasa, enzima limitante en este proceso. Por otro lado, la G6P es un activador alostérico de la glucógeno sintasa. Por tanto, incrementar la entrada y fosforilación de la glucosa implica estimular, de forma alostérica, su síntesis e inhibir su degradación. Así, teniendo en cuenta nuestros resultados *in vivo*, la ausencia del receptor de insulina hepático en los ratones iLIRKO rompe el balance entre la utilización y producción de glucosa por el hígado. Los resultados sugieren que la expresión específica de IRA, en los ratones iLIRKO IRA, induce un incremento en la captación de glucosa, lo que permite una mayor disponibilidad para la síntesis de glucógeno en estos ratones. En este sentido, los niveles de glucógeno en los ratones iLIRKO IRA están significativamente aumentados en comparación con los ratones Control. Este efecto no se explica por la regulación enzimática covalente de las principales proteínas de la cascada, GYS2 y GSK3 α/β , sino que de nuevo la glucosa juega un papel fundamental como regulador alostérico dirigido por las isoformas del receptor de insulina (Gomis *et al.*, 2003; von Wilamowitz-Moellendorf *et al.*, 2013).

La síntesis y el contenido en glucógeno se ven favorecidas por la expresión de la isoforma A del receptor de insulina *in vitro*

Para profundizar en la regulación del metabolismo del glucógeno descrita en el apartado anterior, recurrimos a un abordaje *in vitro* con hepatocitos neonatales. Por tanto, en esta tesis se llevaron a cabo dos aproximaciones experimentales:

1) *in vitro* por medio de estudios con hepatocitos neonatales inmortalizados que expresaban el IR o carecían de él y células que expresaban una u otra isoforma del receptor de insulina, los cuales se discuten a continuación; 2) *in vivo* mediante el uso de los ratones diabéticos iLIRKO que expresaban específicamente IRA o IRB en hígado, discutidos en el apartado anterior.

Como se ha comentado anteriormente, la importancia de la glucosa en el control de la homeostasia glucídica y la síntesis del glucógeno está bien establecida. En situación postprandial, la insulina dirige a la glucosa para restablecer los niveles de glucógeno en el hígado y suprime su salida de éste. Un incremento en la concentración de glucosa en sangre es prerequisite fundamental para la estimulación de la síntesis de glucógeno, la cual incluye la secreción de insulina que activa a PKB e inhibe a GSK3 α/β , quinasa reguladora negativa de GYS2 (Agius, 2008; Frame y Cohen, 2001; von Wilamowitz-Moellendorf *et al.*, 2013). Las isoformas del receptor de insulina ya se han relacionado con una cascada de señalización diferencial en las células β (Escribano *et al.*, 2015; Leibiger *et al.*, 2001). Nuestros resultados *in vitro* sugieren una fuerte correlación entre el aumento en la señalización de insulina y el incremento en la síntesis y almacenamiento de glucógeno en respuesta a la insulina en hepatocitos que expresan la isoforma A frente a los que expresan la isoforma B. Este efecto se ve reforzado por el aumento en la captación de glucosa descrito en los hepatocitos neonatales que expresan IRA en comparación con los que expresan IRB (Nevado *et al.*, 2006).

Por otro lado, la estimulación de la expresión de GLUT2 por glucosa en hepatocitos en cultivo, una de las proteínas descrita como “sensores de glucosa”, se debe a una activación en la transcripción génica

y depende de un metabolismo activo de la glucosa, aunque los metabolitos responsables de este efecto no han sido totalmente identificados. Además, el incremento del G6P intracelular da como resultado un cambio conformacional en la GYS2, el cual la convierte en mejor sustrato para su defosforilación (activación) por la fosfatasa PP1 (Agius, 2008; von Wilamowitz-Moellendorf *et al.*, 2013). La activación de GYS2 por PP1 resulta inhibida por la fosforilación de PYGL. Esta inhibición se elimina con elevadas concentraciones de glucosa (Bollen *et al.*, 1998). En coherencia con esto, la G6P regula también la actividad de GYS2 por activación alostérica, incluso cuando está fosforilada (Stalmans *et al.*, 1997; von Wilamowitz-Moellendorf *et al.*, 2013). Además de un aumento en la captación de glucosa, la disponibilidad de glucosa intracelular está favorecida en los hepatocitos IRA ya que poseen una mayor expresión de GCK, en comparación con los hepatocitos IRB.

En ausencia de IR, los hepatocitos muestran un incremento en la actividad de la GYS2 y, en consecuencia, en la síntesis de glucógeno que se correlaciona con una mayor inhibición de la GSK3 α/β , en comparación con los hepatocitos IRloxP. En cambio, presentan una marcada activación de PYGL y un incremento de G1P, producto directo de la degradación del glucógeno. Estos efectos explicarían por qué, a pesar del marcado incremento de la síntesis de glucógeno, no se observa ningún cambio significativo en el contenido de glucógeno celular sugiriendo la presencia de un ciclo fútil en la regulación de la síntesis/degradación de glucógeno para compensar la menor entrada de glucosa debido a la ausencia del IR (Nevado *et al.*, 2006).

A medida que nuestro conocimiento acerca de las vías de señalización aumenta, es cada vez más importante establecer cuales son los puntos críticos en la vía de regulación. La red de señalización de la insulina ilustra el concepto de puntos críticos, gracias a las relaciones que se han establecido entre sus componentes, validadas por medio de aproximaciones genéticas y bioquímicas tanto *in vitro* como *in vivo* (Taniguchi *et al.*, 2006). Un punto crítico de señalización se define como aquel en el que numerosas isoformas moleculares convergen y están implicadas en procesos de señalización divergentes, altamente regulados y esenciales para las acciones biológicas derivadas de la unión del ligando y que son, en la mayoría de los casos, un punto de *crosstalk* con otros sistemas de señalización. Estos puntos permiten una increíble diversificación en la regulación y un cambio muy fino en la transducción de la señal de la insulina en estados fisiológicos normales o de resistencia. Así, uno de los mayores retos es validar los resultados obtenidos en cuanto a la regulación de los sistemas receptor-ligando *in vitro* en sistemas *in vivo*. En este caso concreto, la translación de resultados desde los hepatocitos neonatales en cultivo al sistema iLIRKO ha sido un reto importante que nos ha permitido no sólo entender los puntos clave en la regulación del metabolismo del glucógeno, sino diseccionar los efectos biológicos a gran escala derivados de la expresión de las isoformas del receptor de insulina.

Papel fundamental del IGF-IR en el metabolismo lipídico hepático

El hígado juega un papel fundamental en la regulación de la glucosa sistémica y el flujo lipídico durante los periodos de alimentación y ayuno además de regular esos mismos sustratos para su propia

energía. Estos requerimientos paralelos están mediados por un control coordinado del flujo de carbohidratos y lípidos el cual se regula, fundamentalmente, por insulina y glucagón. Durante la progresión a la diabetes tipo 2, los carbohidratos hepáticos y el flujo de biosíntesis lipídica se encuentran elevados, por lo que contribuyen a la hiperglucemia e hipertrigliceridemia (Jones, 2016). Estos son los motivos por los que la resistencia a insulina en la diabetes tipo 2, obesidad y dislipidemia es una característica común que se considera además como central en la desregulación del metabolismo de la glucosa y lipídico. Sin embargo, los mecanismos por los que ésta actúa no se conocen en profundidad (Kahn *et al.*, 2005). Los estudios realizados en los ratones LIRKO muestran que la resistencia a insulina hepática causa un perfil proaterogénico, según la distribución del colesterol en el suero, ya que se produce una disminución del 50 % en el colesterol de las HDL. Además, estos ratones muestran una bajada significativa de los triglicéridos en suero y un aumento en el contenido de colesterol hepático (Biddinger *et al.*, 2008). Estos resultados se pierden cuando el estudio lo realizamos en nuestro modelo iLIRKO. La explicación más clara podría ser que los estudios con los animales LIRKO se realizaron a los 6 meses de edad, cuando la hiperglucemia ya se había revertido como consecuencia del severo daño hepático desarrollado.

Por otro lado, aunque el principal papel del IGF-IR se asocia con efectos eminentemente mitogénicos y poco se conoce del IGF-IR en el metabolismo lipídico, su presencia en el hígado parece fundamental para el correcto funcionamiento de éste. Concretamente, la combinación de la falta de IR e IGF-IR en el hígado provoca un decrecimiento significativo en el contenido en triglicéridos hepáticos. Para poder explicar este efecto, estudiamos

los principales genes que participan en la lipogénesis *de novo*. Sin embargo, sólo *Evo/6* disminuye significativamente. Esta disminución se acompaña con una reducción en los niveles de la proteína GCK. Así, por un lado, uno de los sensores de la glucosa estaría disminuido en los hepatocitos de los ratones DKO (carentes de IR e IGF-IR en hígado) y, como consecuencia directa, éstos estarían fosforilando y, por tanto, reteniendo menos glucosa; y por otro lado, la síntesis de ácidos grasos de cadena larga estaría disminuida, lo que afectaría en ambos casos al contenido en triglicéridos. Estudios recientes en ratones muestran que la inhibición de *Evo/6* trae como consecuencia la supresión de la síntesis de ácidos grasos de cadena larga (Mizutani *et al.*, 2009) y se planea probar estos inhibidores en modelos animales de diabetes tipo 2.

El análisis por FPLC del suero de los ratones muestra una marcada disminución en el contenido en colesterol de las partículas HDL en los ratones DKO, en torno al 50 %, en comparación con los Control. Además, estos ratones muestran un menor número de partículas HDL y éstas son más pequeñas. Este defecto viene acompañado por una menor expresión del transportador de colesterol ABCA1 en hígado, encargado de transportar el colesterol a las partículas HDL en formación desde diferentes tejidos. Así, los ratones DKO acumulan partículas HDL nacientes con bajo contenido en colesterol, que podría explicarse por el defecto en ABCA1 que presenta el hígado de estos ratones. Sin embargo, otros factores deben estar implicados en este proceso ya que los ratones iLIRKO presentan también este defecto y sus partículas HDL no se ven modificadas. Nuestros datos sugieren, por tanto, un papel fundamental del receptor de IGF-I en el metabolismo lipídico en un contexto de resistencia a

insulina, más allá de su asociación clásica con procesos mitogénicos.

En conclusión, la resistencia a insulina juega también un papel fundamental en el desarrollo de la dislipidemia. Este hecho es fundamental ya que demuestra que el síndrome metabólico no es sólo un conjunto de anomalías que deban interpretarse y tratarse por separado, sino que además, existen una serie de desajustes en el metabolismo de la glucosa y del colesterol, en los que juega un papel fundamental una señalización de insulina defectuosa.

09/

conclusiones

La resistencia a la acción de la insulina y la disfunción de la célula β son los rasgos más característicos de la diabetes tipo 2. La naturaleza progresiva de la diabetes tipo 2, junto con la relación entre la función de la célula β , y la aparición de hiperglucemia y complicaciones, ha sido reafirmada en diferentes estudios prospectivos (UKPDS, 1998; Weyer *et al.*, 1999; Kahn, 2001). Individuos que presentan resistencia a insulina, son capaces de mantener una tolerancia a glucosa normal, gracias a una hipersecreción adaptativa de insulina que compensa la menor acción de la hormona. En ciertos individuos, estos mecanismos compensatorios fallan con el tiempo, apareciendo hiperglucemia y las manifestaciones clínicas de la diabetes. Comprender la función diferencial de las isoformas del receptor de insulina en el hígado así como su repercusión en la regulación de la homeostasia glucídica y masa de célula β , es clave para discernir el desarrollo de la diabetes tipo 2 y así poder abordarla convenientemente.

Esta tesis se ha centrado en el estudio de la función diferencial de las isoformas del receptor de insulina en el hígado. En una primera parte, se generó el modelo animal en el que se llevaron a cabo los estudios, iLIRKO, y las partículas de AAVs con las isoformas del receptor de insulina necesarias para su expresión *in vivo*. En una segunda parte, se estudió el perfil metabólico hepático *in vivo*, así como su repercusión en la masa de célula β , y las vías de señalización molecular controladas por insulina y glucosa que inciden sobre el control del metabolismo glucídico. La tercera parte profundiza en los mecanismos moleculares de estos procesos utilizando un modelo *in vitro*. Y por último, en la cuarta parte, se abordó, de forma preliminar, el papel *in vivo* del receptor de insulina y de IGF-I en el metabolismo lipídico hepático.

Las conclusiones obtenidas en esta tesis son las siguientes:

1. El modelo iLIRKO es un modelo de progresión a la diabetes tipo 2 en el que

se observa intolerancia a la glucosa y resistencia a insulina, ambos procesos estables en el tiempo.

2. El abordaje inducible se consiguió mediante la administración de dieta con tamoxifeno y esto permitió el desarrollo del fenotipo diabético sin mostrar ninguna patología hepática, mejorando de este modo el modelo constitutivo previamente descrito en la literatura.

3. Los ratones iLIRKO IRA presentan una mejor regulación de la homeostasia glucídica y una disminución de la hiperinsulinemia y de la masa de célula β .

4. La disminución en la masa de célula β en los ratones iLIRKO IRA se debe a una bajada en la proliferación de estas células.

5. La expresión de IRA en el hígado no causa procesos proliferativos de carácter maligno.

6. La expresión de IRA induce un alto contenido en glucógeno, fundamentalmente favorecido por la regulación alostérica que ejerce la glucosa sobre la vía de señalización que regula la síntesis de éste.

7. La falta del IR *in vitro* provoca una síntesis y degradación de glucógeno incrementados, lo que indica la existencia de un ciclo fútil en este punto.

8. El receptor del IGF-I en hígado es clave en la formación de las partículas HDL, ya que su carencia implica que estas sean más pequeñas y con un menor contenido en colesterol.

10/

bibliografía

- Abu-Farha M, Abubaker J, Al-Khairi I, Cherian P, Noronha F, Hu FB, et al. Higher plasma betatrophin/ANGPTL8 level in Type 2 Diabetes subjects does not correlate with blood glucose or insulin resistance (2015). *Sci Rep* 5:10949.
- Accili D, Drago J, Lee EJ, Johnson MD, Cool MH, Salvatore P, et al. Early neonatal death in mice homozygous for a null allele of the insulin receptor gene (1996). *Nat Genet* 12:106-109.
- Agius L. Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism (2008). *Biochem J* 414:1-18.
- Agius L. Role of glycogen phosphorylase in liver glycogen metabolism (2015). *Mol Aspects Med*. 46:34-45.
- Aguirre GA, De Ita JR, de la Garza RG, Castilla-Cortazar I. Insulin-like growth factor-1 deficiency and metabolic syndrome. *Journal of Translational Medicine* (2016). 14:3.
- Alexander IE, Cunningham SC, Logan GJ, Christodoulou J. Potential of AAV vectors in the treatment of metabolic disease (2008). *Gene Ther* 15:831-839.
- Alonso-Chamorro M, Nieto-Vazquez I, Montori-Grau M, Gomez-Foix AM, Fernandez-Veledo S, Lorenzo M. New emerging role of protein-tyrosine phosphatase 1B in the regulation of glycogen metabolism in basal and TNF- α -induced insulin-resistant conditions in an immortalised muscle cell line isolated from mice (2011). *Diabetologia* 55:1157-1168.
- Andersson KB, Winer LH, Mørk HK, Molkentin JD, Jaisser F. Tamoxifen administration routes and dosage for inducible Cre-mediated gene disruption in mouse hearts (2010). *Transgenic Res* 19:715-25.
- Araki E, Lipes MA, Patti ME, Brüning JC, Haag B 3rd, Johnson RS, Kahn CR. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene (1994). *Nature* 372:186-190.
- Arruda VR, Xiao W. It's all about the clothing: capsid domination in the adeno-associated viral vector world (2007). *J Thromb Haemost* 5:12-15.
- Assmann A, Ueki K, Winnay JN, Kadowaki T, Kulkarni RN. Glucose effects on beta-cell growth and survival require activation of insulin receptors and insulin receptor substrate 2 (2009). *Mol Cell Biol* 29:3219-3228.
- Bäck K, Brännmark C, Strålfors P, Arnqvist HJ. Differential effects of IGF-I, IGF-II and insulin in human preadipocytes and adipocytes--role of insu-

- lin and IGF-I receptors (2011). *Mol Cell Endocrinol* 339:130-135.
- Backer JM, Myers MG Jr, Shoelson SE, Chin DJ, Sun XJ, Miralpeix M, et al. Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation (1992). *EMBO J* 11:3469-3479.
- Bartolomé A (2012). Papel del TSC2/m-TORC1 en proliferación, autofagia y estrés de retículo endoplasmático en célula β pancreática (Tesis doctoral).
- Baskaran S, Roach PJ, DePaoli-Roach AA, Hurley TD. Structural basis for glucose-6-phosphate activation of glycogen synthase (2010). *Proc Natl Acad Sci* 107:17563-17568.
- Belfiore A, Frasca F, Pandini G, Sciacca L, Vigneri R. Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease (2009). *Endocr Rev* 30:586-623.
- Belke DD, Betuing S, Tuttle MJ, Graveleau C, Young ME, Pham M, et al. Insulin signaling coordinately regulates cardiac size, metabolism, and contractile protein isoform expression (2002). *J Clin Invest* 109:629-639.
- Benyoucef S, Surinya KH, Hadaschik D, Siddle K. Characterization of insulin/IGF hybrid receptors: contributions of the insulin receptor L2 and Fn1 domains and the alternatively spliced exon 11 sequence to ligand binding and receptor activation (2007). *Biochem J* 403:603-613.
- Bertani, G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli* (1951). *J. Bacteriol* 62:293-300.
- Biddinger SB, Hernandez-Ono A, Rask-Madsen C, Haas JT, Alemán JO, Suzuki R, et al. Hepatic insulin resistance is sufficient to produce dyslipidemia and susceptibility to atherosclerosis (2008). *Cell Metab* 7:125-134.
- Blüher M, Michael MD, Peroni OD, Ueki K, Carter N, Kahn BB, Kahn CR. Adipose tissue selective insulin receptor knockout protects against obesity and obesity-related glucose intolerance (2002). *Dev Cell* 3:25-38.
- Bollen M, Keppens S, Stalmans W. Specific features of glycogen metabolism in the liver (1998). *Biochem J* 336:19-31.
- Bonner-Weir S, Deery D, Leahy JL, Weir GC. Compensatory growth of pancreatic beta-cells in adult rats after short-term glucose infusion (1989). *Diabetes* 38:49-53.
- Boucher J, Kleinridders A, Kahn CR. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states (2014). *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6:a009191.
- Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine (1995). *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:7297-7301.
- Bouzakri K, Roques M, Gual P, Espinosa S, Guebre-Egziabher F, Riou JP, et al. Reduced activation of phosphatidylinositol-3 kinase and increased serine 636 phosphorylation of insulin receptor substrate-1 in primary culture of skeletal muscle cells from patients with type 2 diabetes (2003). *Diabetes* 52:1319-1325.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding (1976). *Anal Biochem* 72:248-254.
- Brown MS, Goldstein JL. Selective versus total insulin resistance: a pathogenic paradox (2008). *Cell Metab* 7:95-96.
- Brüning JC, Michael MD, Winnay JN, Hayashi T, Hörsch D, Accili D, et al. A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance (1998). *Mol Cell* 2:559-569.
- Brüning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, et al. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction (2000). *Science* 289:2122-2125.
- Burcelin R, Eddouks M, Kande J, Assan R, Girard J. Evidence that GLUT-2 mRNA and protein concentrations are decreased by hyperinsulinaemia and increased by hyperglycaemia in liver of diabetic rats (1992). *Biochem J* 288:675-679.
- Burkhardt BR, Parker MJ, Zhang YC, Song S, Wasserfall CH, Atkinson MA. Glucose transporter-2 (GLUT2) promoter mediated transgenic insulin production reduces hyperglycemia in diabetic mice (2005). *FEBS Lett* 579:5759-5764.
- Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC. Beta-cell deficit and increa-

- sed beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes (2003). *Diabetes* 52:102–110.
- Cai D, Dhe-Paganon S, Melendez PA, Lee J, Shoelson SE. Two new substrates in insulin signaling, IRS5/DOK4 and IRS6/DOK5 (2003). *J Biol Chem* 278:25323–25330.
- Chettouh H, Fartoux L, Aoudjehane L, Wendum D, Clapéron A, Chrétien Y, et al. Mitogenic insulin receptor-A is overexpressed in human hepatocellular carcinoma due to EGFR-mediated dysregulation of RNA splicing factors (2013). *Cancer Res* 73:3974–3986.
- Chick WL, Like AA. Studies in the diabetic mutant mouse. 3. Physiological factors associated with alterations in beta cell proliferation (1970). *Diabetologia* 6:243–251.
- Cho H, Mu J, Kim JK, Thorvaldsen JL, Chu Q, Crenshaw EB 3rd, et al. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta) (2001). *Science* 292:1728–1731.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction (1987). *Anal Biochem* 162:156–159.
- Cook JR, Langlet F, Kido Y, Accili D. Pathogenesis of selective insulin resistance in isolated hepatocytes (2015). *J Biol Chem* 290:13972–80.
- Copps KD, White MF. Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2 (2012). *Diabetologia* 55:2565–2582.
- Cox AR, Lam CJ, Bonnyman CW, Chavez J, Rios JS, Kushner JA. Angiopoietin-like protein 8 (ANGPTL8)/betatrophin overexpression does not increase beta cell proliferation in mice (2015). *Diabetologia* 58:1523–31.
- Denley A, Bonython ER, Booker GW, Cosgrove LJ, Forbes BE, Ward CW, Wallace JC. Structural determinants for high-affinity binding of insulin-like growth factor II to insulin receptor (IR)-A, the exon 11 minus isoform of the IR (2004). *Mol Endocrinol* 18:2502–2512.
- Desta Z, Ward BA, Soukhova NV, Flockhart DA. Comprehensive evaluation of tamoxifen sequential biotransformation by the human cytochrome P450 system in vitro: prominent roles for CYP3A and CYP2D6 (2004). *J Pharmacol Exp Ther* 310:1062–1075.
- Doble BW, Woodgett JR. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase (2003). *J Cell Sci* 116:1175–1186.
- Duffy D, Rader DJ. Update on strategies to increase HDL quantity and function (2009). *Nat Rev Cardiol* 6:455–463.
- Edvell A, Lindström P. Development of insulin secretory function in young obese hyperglycemic mice (Umeå ob/ob) (1995). *Metabolism* 44:906–913.
- Eisenberg ML, Maker AV, Slezak LA, Nathan JD, Sritharan KC, Jena BP, et al. Insulin Receptor (IR) and Glucose Transporter 2 (GLUT2) Proteins Form a Complex on the Rat Hepatocyte Membrane (2005). *Cell Physiol Biochem* 15:51–58.
- Emanuelli B, Vienberg SG, Smyth G, Cheng C, Stanford KI, Arumugam M, et al. Interplay between FGF21 and insulin action in the liver regulates metabolism (2014). *J Clin Invest* 124:515–527.
- Escribano O, Guillén C, Nevado C, Gómez-Hernández A, Kahn CR, Benito M. Beta-Cell hyperplasia induced by hepatic insulin resistance: role of a liver-pancreas endocrine axis through insulin receptor A isoform (2009). *Diabetes* 58:820–828.
- Escribano O, Gómez-Hernández A, Díaz-Castroverde S, Nevado C, García G, Otero YF, et al. Insulin receptor isoform A confers a higher proliferative capability to pancreatic beta cells enabling glucose availability and IGF-I signaling (2015). *Mol Cell Endocrinol* 409:82–91.
- Fantin VR, Wang Q, Lienhard GE, Keller SR. Mice lacking insulin receptor substrate 4 exhibit mild defects in growth, reproduction, and glucose homeostasis (2003). *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278:E127–133.
- Feingold KR, Grunfeld C. (2015) Introduction to Lipids and Lipoproteins. South Dartmouth (MA): MDText.com.
- Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues (1957). *J Biol Chem* 226:497–509.
- Folli F, Saad MJ, Backer JM, Kahn CR. Insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity

- and association with insulin receptor substrate 1 in liver and muscle of the intact rat (1992). *J Biol Chem* 267:22171-22177.
- Folli F, Bonfanti L, Renard E, Kahn CR, Merighi A. Insulin receptor substrate-1 (IRS-1) distribution in the rat central nervous system (1994). *J Neurosci* 14:6412-6422.
- Frame S, Cohen P. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery (2001). *Biochem J* 359:1-16.
- Frasca F, Pandini G, Scalia P, Sciacca L, Mineo R, Costantino A, et al. Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells (1999). *Mol Cell Biol* 19:3278-3288.
- Gomis RR, Favre C, García-Rocha M, Fernández-Novell JM, Ferrer JC, Guinovart JJ. Glucose 6-phosphate produced by gluconeogenesis and by glucokinase is equally effective in activating hepatic glycogen synthase (2003). *J Biol Chem* 278:9740-9746.
- Gonçalves MA. Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector (2005). *Virol J* 2:43.
- Gonzalez-Aseguinolaza G, Prieto J. Gene therapy of liver diseases: a 2011 perspective (2011). *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 35:699-708.
- Grieger JC, Choi VW, Samulski RJ. Production and characterization of adeno-associated viral vectors (2006). *Nat Protoc* 1:1412-1428.
- Grimm D, Kay MA, Kleinschmidt JA. Helper virus-free, optically controllable, and two-plasmid-based production of adeno-associated virus vectors of serotypes 1 to 6 (2003). *Mol Ther* 7:839-850.
- Gu H, Marth JD, Orban PC, Mossmann H, Rajewsky K. Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting (1994). *Science* 265:103-106.
- Guerra C, Navarro P, Valverde AM, Arribas M, Brüning J, Kozak LP, et al. Brown adipose tissue-specific insulin receptor knockout shows diabetic phenotype without insulin resistance (2001). *J Clin Invest* 108:1205-1213.
- Gusarova V, Alexa CA, Na E, Stevis PE, Xin Y, Bonner-Weir S, et al. ANGPTL8/betatrophin does not control pancreatic beta cell expansion (2014). *Cell* 159:691-696.
- Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids (1983). *Journal of Molecular Biology* 166:557-580.
- Hoeflich KP, Luo J, Rubie EA, Tsao MS, Jin O, Woodgett JR. Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation (2000). *Nature* 406:86-90.
- Holst JJ, Gromada J. Role of incretin hormones in the regulation of insulin secretion in diabetic and nondiabetic humans (2004). *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287:E199-E206.
- Hoorens A, van de Casteele M, Klöppel G, Pipeleers D. Glucose promotes survival of rat pancreatic beta cells by activating synthesis of proteins which suppress a constitutive apoptotic program (1996). *J Clin Invest* 98:1568-1574.
- Huang C, Snider F, Cross JC. Prolactin receptor is required for normal glucose homeostasis and modulation of beta-cell mass during pregnancy (2009). *Endocrinology* 150:1618-1626.
- International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 7th edn. Brussels, Belgium:
- International Diabetes Federation, 2015.
- Islam MS, Wilson RD. Experimentally induced rodent models of type 2 diabetes (2012). *Methods Mol Biol* 933:161-174.
- Johnson MD, Zuo H, Lee KH, Trebley JP, Rae JM, Weatherman RV, et al. Pharmacological characterization of 4-hydroxy-N-desmethyl tamoxifen, a novel active metabolite of tamoxifen (2004). *Breast Cancer Res Treat* 85:151-9.
- Jones JG. Hepatic glucose and lipid metabolism (2016). *Diabetologia* 59:1098-1103.
- Kahn R, Buse J, Ferrannini E, Stern M. The metabolic syndrome (2005). *Lancet* 366:1921-1922.
- Katz EB, Stenbit AE, Hatton K, DePinho R, Charron MJ. Cardiac and adipose tissue abnormalities but not diabetes in mice deficient in GLUT4 (1995). *Nature* 377:151-155.
- Kühbandner S, Brummer S, Metzger D, Chambon P, Hofmann F, Feil R. Temporally controlled somatic mutagenesis in smooth muscle (2000). *Genesis* 28:15-22.
- Kulkarni RN, Brüning JC, Winnay JN, Postic C,

- Magnuson MA, Kahn CR. Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic beta cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes (1999). *Cell* 96:329-339.
- Kulkarni RN, Holzenberger M, Shih DQ, Ozcan U, Stoffel M, Magnuson MA, Kahn CR. Beta-cell-specific deletion of the Igf1 receptor leads to hyperinsulinemia and glucose intolerance but does not alter beta-cell mass (2002). *Nat Genet* 31:111-115.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 (1970). *Nature* 227:680-685.
- Lauro D, Kido Y, Castle AL, Zarnowski MJ, Hayashi H, Ebina Y, Accili D. Impaired glucose tolerance in mice with a targeted impairment of insulin action in muscle and adipose tissue (1998). *Nat Genet* 20:294-298.
- Laustsen PG, Michael MD, Crute BE, Cohen SE, Ueki K, Kulkarni RN, et al. Lipoatrophic diabetes in *Irs1(-/-)/Irs3(-/-)* double knockout mice (2002). *Genes Dev* 16:3213-3222.
- Leibiger B, Leibiger IB, Moede T, Kemper S, Kulkarni RN, Kahn CR, et al. Selective insulin signaling through A and B insulin receptors regulates transcription of insulin and glucokinase genes in pancreatic beta cells (2001). *Mol Cell* 7:559-570.
- Leibowitz G, Yuli M, Donath MY, Nesher R, Melloul D, Cerasi E, et al. beta-cell glucotoxicity in the *Psammomys obesus* model of type 2 diabetes (2001). *Diabetes* 50:S113-S117.
- Leone DP, Genoud S, Atanasoski S, Grausenburger R, Berger P, Metzger D, et al. Tamoxifen-inducible glia-specific Cre mice for somatic mutagenesis in oligodendrocytes and Schwann cells (2003). *Mol Cell Neurosci* 22:430-440.
- Lingohr MK, Briaud I, Dickson LM, McCuaig JF, Alárcon C, Wicksteed BL, Rhodes CJ. Specific regulation of IRS-2 expression by glucose in rat primary pancreatic islets beta-cells (2006). *J Biol Chem* 281:15884-15892.
- Lipson KL, Fonseca SG, Ishigaki S, Nguyen LX, Foss E, Bortell R, et al. Regulation of insulin biosynthesis in pancreatic beta cells by an endoplasmic reticulum-resident protein kinase IRE1 (2006). *Cell Metab* 4:245-254.
- Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r) (1993). *Cell* 75:59-72.
- MacAulay K, Doble BW, Patel S, Hansotia T, Sinclair EM, Drucker DJ, et al. Glycogen synthase kinase 3alpha-specific regulation of murine hepatic glycogen metabolism (2007). *Cell Metab* 6:329-37.
- Madisen L, Zwingman TA, Sunkin SM, Oh SW, Zariwala HA, Gu H, Ng LL, Palmiter RD, Hawrylycz MJ, Jones AR, Lein ES, Zeng H. A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain (2010). *Nat Neurosci* 13:133-40.
- Maedler K, Spinas GA, Lehmann R, Sergeev P, Weber M, Fontana A, et al. Glucose induces beta-cell apoptosis via upregulation of the Fas receptor in human islets (2001). *Diabetes* 50:1683-1690.
- Malaguarnera R, Belfiore A. The insulin receptor: a new target for cancer therapy (2011). *Front Endocrinol (Lausanne)* 2:1-16.
- Marcuello C, Calle-Pascual AL, Fuentes M, Runkle I, Soriguer F, Goday A, Bosch-Comas A, et al. Evaluation of Health-Related Quality of Life according to Carbohydrate Metabolism Status: A Spanish Population-Based Study (Di@bet.es Study) (2012). *Int J Endocrinol* 2012:872305-872311.
- McCarty DM, Young SM Jr, Samulski RJ. Integration of adeno-associated virus (AAV) and recombinant AAV vectors (2004). *Annu Rev Genet* 38:819-845.
- McManus EJ, Sakamoto K, Armit LJ, Ronaldson L, Shpiro N, Marquez R, Alessi DR. Role that phosphorylation of GSK3 plays in insulin and Wnt signalling defined by knockin analysis (2005). *EMBO J* 24:1571-83.
- Medina M, Wandosell F. Deconstructing GSK-3: The Fine Regulation of Its Activity (2011). *Int J Alzheimers Dis* ID 479249.
- Meier JJ, Butler AE, Saisho Y, Monchamp T, Galasso R, Bhushan A, et al. Beta-cell replication is the primary mechanism subserving the postnatal expansion of beta-cell mass in humans (2008). *Diabetes* 57:1584-1594.
- Menting JG, Whittaker J, Margetts MB, Whittaker LJ, Kong GK, Smith BJ, et al. How insulin engages its primary binding site on the insulin receptor

(2013). *Nature* 493:241-245.

Metzger D, Chambon P. Site- and time-specific gene targeting in the mouse (2001). *Methods* 24:71-80.

Metzger D, Chambon P. Generation of Spatio-Temporally Controlled Targeted Somatic Mutations in the Mouse (2011). *Curr Protoc Mouse Biol* 1:55-70.

Michael MD, Kulkarni RN, Postic C, Previs SF, Shulman GI, Magnuson MA, Kahn CR. Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction (2000). *Mol Cell* 6:87-97.

Mizutani T, Ishikawa S, Nagase T, Takahashi H, Fujimura T, Sasaki T, et al. Discovery of novel benzoxazinones as potent and orally active long chain fatty acid elongase 6 inhibitors (2009). *J Med Chem* 52:7289-7300.

Montanya E, Nacher V, Biarnés M, Soler J. Linear correlation between beta-cell mass and body weight throughout the lifespan in Lewis rats: role of beta-cell hyperplasia and hypertrophy (2000). *Diabetes* 49:1341-1346.

Muoio DM, Newgard CB. Metabolism: A is for adipokine (2005). *Nature* 436:337-338.

Murillo O, Luqui DM, Gazquez C, Martinez-Espartosa D, Navarro-Blasco I, Monreal JJ, et al. Long-term metabolic correction of Wilson's disease in a murine model by gene therapy (2016). *J Hepatol* 64:419-426.

Murphy R, Ellard S, Hattersley AT. Clinical implications of a molecular genetic classification of monogenic beta-cell diabetes (2008). *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 4:200-213.

Naïmi M, Arous C, Van Obberghen E. Energetic cell sensors: a key to metabolic homeostasis (2010). *Trends Endocrinol Metab* 21:75-82.

Nakai H, Fuess S, Storm TA, Muramatsu S, Nara Y, Kay MA. Unrestricted hepatocyte transduction with adeno-associated virus serotype 8 vectors in mice (2005). *J Virol* 79:214-224.

Nandi A, Kitamura Y, Kahn CR, Accili D. Mouse models of insulin resistance (2004). *Physiol Rev* 84:623-647.

Neubauer N, Kulkarni RN. Molecular approaches to study control of glucose homeostasis (2006). *ILAR J.* 47:199-211.

Nevado C, Valverde AM, Benito M. Role of insulin receptor in the regulation of glucose uptake in neonatal hepatocytes (2006). *Endocrinology* 147:3709-3718.

Newgard CB, Quaaade C, Hughes SD, Milburn JL. Glucokinase and glucose transporter expression in liver and islets: implications for control of glucose homeostasis (1990). *Biochem Soc Trans* 18:851-853.

El Ouaamari A, Kawamori D, Dirice E, Liew CW, Shadrach JL, Hu J, et al. Liver-derived systemic factors drive β cell hyperplasia in insulin-resistant states (2013). *Cell Rep* 3:401-10.

El Ouaamari A, Dirice E, Gedeon N, Hu J, Zhou JY, Shirakawa J, et al. SerpinB1 Promotes Pancreatic β Cell Proliferation (2016). *Cell Metab* 23:194-205.

Pagès G, Guérin S, Grall D, Bonino F, Smith A, Anjuere F, et al. Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice (1999). *Science* 286:1374-1377.

Pandini G, Frasca F, Mineo R, Sciacca L, Vigneri R, Belfiore A. Insulin/insulin-like growth factor I hybrid receptors have different biological characteristics depending on the insulin receptor isoform involved (2002). *J Biol Chem* 277:39684-39695.

Patel S, Doble BW, MacAulay K, Sinclair EM, Drucker DJ, Woodgett JR. Tissue-specific role of glycogen synthase kinase 3 β in glucose homeostasis and insulin action (2008). *Mol Cell Biol* 28:6314-28.

Patel S, Macaulay K, Woodgett JR. Tissue-specific analysis of glycogen synthase kinase-3 α (GSK-3 α) in glucose metabolism: effect of strain variation (2011). *PLoS One* 6:e15845.

Pechhold K, Koczwara K, Zhu X, Harrison VS, Walker G, et al. Blood glucose levels regulate pancreatic beta-cell proliferation during experimentally-induced and spontaneous autoimmune diabetes in mice (2009). *PLoS ONE* 4:e4827.

Pick A, Clark J, Kubstrup C, Levisetti M, Pugh W, et al. Role of apoptosis in failure of beta-cell mass compensation for insulin resistance and beta-cell defects in the male Zucker diabetic fatty rat (1998). *Diabetes* 47:358-364. Zucker diabetic fatty rat (1998). *Diabetes* 47:358-364.

Raupp C, Naumer M, Müller OJ, Gurda BL, Agbandje-McKenna M, Kleinschmidt JA. The

- threefold protrusions of adeno-associated virus type 8 are involved in cell surface targeting as well as postattachment processing (2012). *J Viro* 86:9396-9408.
- Rieck S, Kaestner KH. Expansion of beta-cell mass in response to pregnancy (2010). *Trends Endocrinol Metab* 21:151-158.
- Roach PJ, Depaoli-Roach AA, Hurley TD, Tagliabracchi VS. Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes (2012). *Biochem J* 441:763-787.
- Robertson RP. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes (2004). *J Biol Chem* 279:42351-42354.
- Root-Bernstein R, Vonck J. Glucose binds to the insulin receptor affecting the mutual affinity of insulin and its receptor (2009). *Cell Mol Life Sci* 66:2721-2732.
- Russell ND, Cooper ME. 50 years forward: mechanisms of hyperglycaemia-driven diabetic complications (2015). *Diabetologia* 58:1708-1714.
- Russell WC, Newman C, Williamson DH. A simple cytochemical technique for demonstration of DNA in cells infected with mycoplasmas and viruses (1975). *Nature* 253:461-462.
- Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism (2001). *Nature* 414:799-806.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual (1989). NY. Cold Spring Harbor.
- Sands MS. AAV-mediated liver-directed gene therapy (2011). *Methods Mol Biol* 807:141-157.
- Sauer B, Henderson N. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1 (1988). *Proc Natl Acad Sci USA* 85:5166-70.
- Sauer B, Henderson N. Cre-stimulated recombination at loxP-containing DNA sequences placed into the mammalian genome (1989). *Nucleic Acids Res* 17:147-161.
- Scaglia L, Smith FE, Bonner-Weir S. Apoptosis contributes to the involution of beta cell mass in the post partum rat pancreas (1995). *Endocrinology* 136:5461-5468.
- Scaglia L, Cahill CJ, Finegood DT, Bonner-Weir S. Apoptosis participates in the remodeling of the endocrine pancreas in the neonatal rat (1997). *Endocrinology* 138:1736-1741.
- Schuler M, Dierich A, Chambon P, Metzger D. Efficient temporally controlled targeted somatic mutagenesis in hepatocytes of the mouse (2004). *Genesis* 39:167-172.
- Schwarz JM, Linfoot P, Dare D, Aghajanian K. Hepatic de novo lipogenesis in normoinsulinemic and hyperinsulinemic subjects consuming high-fat, low-carbohydrate and low-fat, high-carbohydrate isoenergetic diets (2003). *Am J Clin Nutr* 77:43-50.
- Shaw LM. The insulin receptor substrate (IRS) proteins: at the intersection of metabolism and cancer (2011). *Cell Cycle* 10:1750-1756.
- Siddle K. Molecular basis of signaling specificity of insulin and IGF receptors: neglected corners and recent advances (2012). *Front Endocrinol (Lausanne)* 3:34.
- Slaaby R, Schäffer L, Lautrup-Larsen I, Andersen AS, Shaw AC, Mathiasen IS, Brandt J. Hybrid receptors formed by insulin receptor (IR) and insulin-like growth factor I receptor (IGF-IR) have low insulin and high IGF-1 affinity irrespective of the IR splice variant (2006). *J Biol Chem* 281:25869-25874.
- Sommer JM, Smith PH, Parthasarathy S, Isaacs J, Vijay S, Kieran J, et al. Quantification of adeno-associated virus particles and empty capsids by optical density measurement (2003). *Mol Ther* 7:122-128.
- Sonawane ND, Szoka FC Jr, Verkman AS. Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes (2003). *J Biol Chem* 278:44826-44831.
- Sorenson RL, Brelje TC. Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: beta-cell growth, enhanced insulin secretion and the role of lactogenic hormones (1997). *Horm Metab Res* 29:301-307.
- Stalmans W, Cadefau J, Wera S, Bollen M. New insight into the regulation of liver glycogen metabolism by glucose (1997). *Biochem Soc Trans* 25:19-25.
- Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy (2005). *Lancet* 365:1333-1346.

- Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA, et al. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein (1991). *Nature* 352:73-77.
- Taguchi A, White MF. Insulin-like signaling, nutrient homeostasis, and life span (2008). *Annu Rev Physiol* 70:191-212.
- Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action (2006). *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:85-96.
- Tannour-Louet M, Porteu A, Vaulont S, Kahn A, Vasseur-Cognet M. A tamoxifen-inducible chimeric Cre recombinase specifically effective in the fetal and adult mouse liver (2002). *Hepatology* 35:1072-1081.
- Taylor SI. Lilly Lecture: molecular mechanisms of insulin resistance. Lessons from patients with mutations in the insulin-receptor gene (1992). *Diabetes* 41:1473-1490.
- Teta M, Rankin MM, Long SY, Stein GM, Kushner JA. Growth and regeneration of adult beta cells does not involve specialized progenitors (2007). *Dev Cell* 12:817-826.
- Trigatti B, Rayburn H, Viñals M, Braun A, Miettinen H, Penman M, et al. Influence of the high density lipoprotein receptor SR-BI on reproductive and cardiovascular pathophysiology (1999). *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:9322-9327.
- Van Assche FA, Aerts L, De Prins F. A morphological study of the endocrine pancreas in human pregnancy (1978). *Br J Obstet Gynaecol* 85:818-838.
- Vance MA, Mitchell A, Samulski RJ. (2015) Gene Therapy - Principles and Challenges (Cap 5 pp. 119-143). InTech.
- Vanrell L, Di Scala M, Blanco L, Otano I, Gil-Farina I, Baldim V, et al. Development of a liver-specific Tet-on inducible system for AAV vectors and its application in the treatment of liver cancer (2011). *Mol Ther* 19:1245-53.
- Villar-Palasi C, Guinovart JJ. The role of glucose 6-phosphate in the control of glycogen synthase (1997). *FASEB J* 11:544-558.
- Voliovitich H, Schindler DG, Hadari YR, Taylor SI, Accili D, Zick Y. Tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 in vivo depends upon the presence of its pleckstrin homology region (1995). *J Biol Chem* 270:18083-18087.
- Ward CW, Lawrence MC. Ligand-induced activation of the insulin receptor: a multi-step process involving structural changes in both the ligand and the receptor (2009). *Bioessays*. 31:422-434.
- White MF. Regulating insulin signaling and beta-cell function through IRS proteins (2006). *Can J Physiol Pharmacol* 84:725-737.
- Whitfield J, Littlewood T, Soucek L. Tamoxifen administration to mice (2015). *Cold Spring Harb Protoc* 2015:269-271.
- Whittaker J, Sørensen H, Gadsbøll VL, Hinrichsen J. Comparison of the functional insulin binding epitopes of the A and B isoforms of the insulin receptor (2002). *J Biol Chem* 277:47380-47384.
- von Wilamowitz-Moellendorff A, Hunter RW, García-Rocha M, Kang L, López-Soldado I, Lantier L, et al. Glucose-6-phosphate-mediated activation of liver glycogen synthase plays a key role in hepatic glycogen synthesis (2013). *Diabetes* 62:4070-4082.
- Wilson CH, Gamper I, Perfetto A, Auw J, Littlewood TD, Evan GI. The kinetics of ER fusion protein activation in vivo (2014). *Oncogene* 33:4877-80.
- Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S, et al. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice (1998). *Nature* 391:900-904.
- Wu Z, Asokan A, Samulski RJ. Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy (2006). *Mol Ther* 14:316-327.
- Wu Z, Yang H, Colosi P. Effect of Genome Size on AAV Vector Packaging (2010). *Mol Ther* 18:80-86.
- Xuan S, Kitamura T, Nakae J, Politi K, Kido Y, Fisher PE, et al. Defective insulin secretion in pancreatic beta cells lacking type 1 IGF receptor (2002). *J Clin Invest* 110:1011-1019.
- Yakar S, Liu JL, Stannard B, Butler A, Accili D, Sauer B, LeRoith D. Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I (1999). *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:7324-7329.
- Yamaguchi Y, Flier JS, Benecke H, Ransil BJ, Moller DE. Ligand-binding properties of the two

isoforms of the human insulin receptor (1993). *Endocrinology* 132:1132-1138.

Yi P, Park JS, Melton DA. Betatrophin: a hormone that controls pancreatic β cell proliferation (2013). *Cell* 153:747-58.

Zincarelli C, Soltys S, Rengo G, Rabinowitz JE. Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection (2008). *Mol Ther* 16:1073-1080.

Zolotukhin S, Byrne BJ, Mason E, Zolotukhin I, Potter M, Chesnut K, et al. Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield (1999). *Gene Ther* 6:973-85.

